CHARLES EDMOND PÉQUIGNAT

Biologie des Echinocardium cordatum (Pennant) de la Baie de Seine

Nouvelles Recherches sur la Digestion et l'Absorption cutanées chez les Echinides et les Stellérides

Cet article contient l'essentiel de la première thèse de doctorat de M.r E. Péquignat, soutenue devant la Faculté des Sciences de l'Université de Caen le 17 juin 1969 et enregistrée au Service de Documentation du C.N.R.S. sous le N°: A.O. 3344.

Jury:

Président: P.r P. Lubet

Membres: P.r Ch. Bocquet
P.r N. Demeusy
P.r P. Fromageot

RIJKS LEIDEN BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

https://archive.org/details/IA41547014_0009

forma et functio, volume 2, 1970, page 121–168

Biologie des Echinocardium cordatum (Pennant) de la Baie de Seine

Nouvelles Recherches sur la Digestion et l'Absorption cutanées chez les Echinides et les Stellérides

On the Biology of Echinocardium cordatum (Pennant) of the Seine Estuary

New Researches on Skin-Digestion and epidermal Absorption in Echinoidea and Asteroidea

Biologie von Echinocardium cordatum (Pennant) der Seine-Bucht

Neue Untersuchungen über die perkutane Verdauung und Resorption bei den Echinoidea und Asteroidea

CHARLES EDMOND PEQUIGNAT

Laboratoire de Zoologie de l'Université de Caen et Station biologique de Luc-sur-mer (Calvados), France

Author's address: Dr. E. Péquignat, 2, rue de Buron, Calvaire St-Pierre, F-14 Caen (France)

(Received/Eingegangen: November 8, 1969)

Résumé: L'étude des *Echinocardium cordatum* de la Baie de Seine montre que ces animaux recherchent des sables fins, calcaires avec un limon organique superficiel et ne dépassent pas 30 m de fond. Les quelques stations intercotidales ne sont que les expansions avancées d'une colonie très dense vivant un peu plus au large. La vie de l'espèce est estimée à 3 1/2 – 4 ans. Aux âges de 1 et 2 ans, les longueurs moyennes sont de 22 mm et 36 mm.

Au laboratoire, ces animaux recherchent le sable bien irrigué et se disposent dans l'axe des courants. Le rhéotropisme négatif s'inverse à partir d'une certaine vitesse. Les podia dorsaux sont attirés par les aliments organiques qu'ils tirent sous la crête apicale. Le mucus qui les imprègne ne s'écoule qu'en partie vers la bouche: le mucus en excès déborde de chaque côté de l'encoche frontale; il est étalé par les piquants aboraux en une calotte poisseuse qui se continue par le drain subanal. Beaucoup de particules organiques ou de petites proies sont prédigérées dans le sillon – ou rejetées sur la calotte. La bouche protégée par ses podia pénicillés ne reçoit que des aliments dissous ou très divisés.

Cette «digestion cutanée» a été méthodiquement observée et concerne aussi des oursins réguliers comme *Psammechinus* où du mucus s'écoule dans les rainures des piquants. On l'observe aussi chez les astéries (*Marthasterias* en particulier) et des ophiures.

Le phénomène s'accompagne d'une sortie par diapédèse à travers l'épiderme de nombreux coelomocytes à sphérules, incolores ou colorés.

Des enzymes ont été recherchés dans le mucus ou des extraits d'organes externes (clavules, branchies). «In vitro», des résultats très positifs sont obtenus pour l'amylase et les arylamidases. Il y a des endopeptidases (action sur plaques de gélatine) mais leur caractérisation précise «in vitro» est difficile.

Des amino-acides marqués au ^{14}C et ^{3}H, du ^{14}C glucose sont absorbés très rapidement même à doses infinitésimales ($4 \cdot 10^{-7}$ mM/l) par les oursins qui les concentrent de 20 à 100 fois. Une minuscule astérie de 2 mg concentre 628 fois le tryptophane. Le test des oursins retient la grande majorité de la masse absorbée. Des extraits protéiques de moules fortement marqués au tritium comme des branchies fraîches de moules marquées au ^{14}C sont soumis à une digestion cutanée apicale sur des oursins ou une *Marthasterias*. On retrouve avec un rendement de 6 à 75 % la radioactivité de l'aliment dans les organes, et particulièrement dans le test, les piquants et le tégument (plus de 55 %) alors qu'un *Psammechinus* nourri par la bouche de branchie de moule radioactive fixera à 65 % la radioactivité dans son tube digestif.

Il semble que des oursins soient encore capables de capter dans l'eau ambiante des macromolécules comme la caséine et de fins flagellés colorés plus ou moins rapidement digérés.

En conclusion, il semble que les échinodermes puissent se nourrir au moins partiellement par microphagie aux dépens de molécules dissoutes, de macromolécules retenues dans le mucus et de petites proies digérées par l'action combinée du mucus épidermique et des coelomocytes émigrés. Il en est peut être ainsi chez d'autres animaux microphages à épiderme cilié.

Abstract: *Echinocardium cordatum* in the Seine estuary is found in fine calcareous sands with an organic superficial film at a depth never exceeding 16 fathoms. The few in-shore stations explored show out but the vanguards of a very dense offshore population. The longevity is estimated from 3 1/2 to 4 years with a mean growth of 22 mm in the first year to reach 36 mm after 2 years.

In the laboratory, the animals are attracted into well irrigated sand, setting themselves along the streamlines. As a rule they move upstream but will rush downstream if the watercurrent is fast. The dorsal podia are sensitive to the organic particles of the surface which they pull down into the aboral furrow under the apical crest. There, the mucus partly gathers in a mucous string pushed down towards the mouth but the surplus leaks out on both sides of the frontal notch; it is then stretched backwards by the dorsal spines into a sticky cap which trails into the subanal drain.

Many particles or small preys are digested in the furrow – or otherwise rejected into the mucus cap. Consequently, the mouth, protected by the surrounding penicillate podia, will receive but dissolved or finely dissociated material.

This *"skin-digestion"* has been methodically observed; not only heart-urchins but regular ones as *Psammechinus* are concerned. (There, the less abundant mucus flows out along the spine-grooves.) *Marthasterias* (Asteroidea) and such brittle stars as *Ophiothrix* behave in a similar way.

The epidermic nutrition of urchins is concomitant with an *important outflow of coelomocytes* (colourless, red and yellow ones).

Enzymes have been searched for in the mucus or in extracts of such external organs as clavulae or branchial tufts. In vitro, very conspicuous results were obtained with starch (α-amylase) and leucyl-naphthylamide (arylamidases). Endopeptidases must exist, as shown by gelatinhydrolysis on substrate-films, but their precise determination is difficult.

^{14}C- and tritium-labelled aminoacids as well as ^{14}C-dextrose are very quickly absorbed from marine solutions – even the most diluted ($4 \cdot 10^{-7}$mM/l) by urchins. They concentrate them from 20 to 100 times, mostly in their test. A tiny 2 mg *Asterias* could concentrate tryptophan 628 times.

Labelled protein extracts or fresh radioactive mussel-gills were used as skin "nutrients" with both urchins and *Marthasterias*. The radioactivity is recovered (mostly in the tests or teguments) at a rate of 6 to 75 % – whereas a *Psammechinus* fed with the same material through the mouth incorporates 65 % of the activity in the gut-wall.

It appears that urchins may be able to take up from the environment such macromolecules as casein or tiny coloured flagellates (partly digested in the mucus).

As a conclusion, it is likely that Echinoderms can get at least a significant part of their food through microphagy either from dissolved nutrients, or macromolecules retained in the mucus and more especially from small preys or organic particles digested by the combined action of the epidermal mucus and emigrated coelomocytes. That might be also the case of many other "ciliary-mucous-feeders".

Zusammenfassung: *Echinocardium cordatum* lebt in der Seine-Bucht in einer Tiefe von maximal 30 m auf feinem Kalksand, der mit einer dünnen Schicht organischen Materials bedeckt ist. Die Lebensdauer beträgt ca. 3 1/2 bis 4 Jahre, die durchschnittliche Größe im ersten Jahr 22 mm, im zweiten 36 mm.

Die wenigen in Küstennähe gefundenen Tiere stammen aus einer großen küstenfernen Population.

Im Labor bevorzugen die Tiere gut durchströmten Sand. Die ursprünglich positive Rheotaxis wird bei zu starker Strömung negativ. Die dorsalen Ambulakralfüßchen befördern organisches Material in eine aborale Furche unter dem Apex. Dort sammelt sich Schleim, der zur Mundöffnung hinunterläuft. Überschüssiger Schleim läuft an beiden Seiten der Kerbe hinaus, und die dorsalen Stacheln formen daraus eine klebrige Haube, die sich in einer subanalen Abzugsbahn fortsetzt.

Viele organische Partikeln oder kleine Beute werden entweder in der Furche verdaut oder in die Schleimhaube transportiert, so daß die durch pinselförmige Ambulakralfüßchen geschützte Mundöffnung nur gelöstes oder fein zerteiltes Material erhält. Diese percutane Verdauung wurde bei irregulären und regulären Seeigeln untersucht. Bei *Psammechinus* läuft relativ wenig Schleim die Stachelgruben entlang. *Marthasterias* (Asteroidea) und *Ophiothrix* verhalten sich ähnlich.

An der epidermalen Nahrungsaufnahme sind auswandernde farblose, rote oder gelbe Coelomocyten beteiligt.

Schleim und Extrakte von Clavulae und Büschelkiemen wurden auf Enzyme hin untersucht. In vitro konnten α-Amylase und Arylamidasen nachgewiesen werden, ebenso Endopeptidasen, deren genaue Bestimmung jedoch schwierig ist.

^{14}C- und Tritium-markierte Aminosäuren und ^{14}C-Glucose wurden auch in starker Verdünnung ($4 \cdot 10^{-7}$ mM/l) schnell von den Seeigeln absorbiert und, besonders in der Schale, bis auf das 20–100fache angereichert, von einem 2 mg schweren *Asterias* sogar auf das 628fache. Mit Tritium markierte Proteinextrakte und frische ^{14}C-markierte Muschelkiemen dienten als „Hautnahrung" für Seeigel und *Marthasterias*. 6–76 % der Aktivität fand sich besonders in der Schale und dem Integument wieder. Ein mit dem gleichen Material durch den Mund gefütterter *Psammechinus* baute 65 % in die Darmwand ein.

Seeigel können also aus ihrer Umgebung winzige Flagellaten, die teilweise im Schleim verdaut werden, und Makromoleküle wie z.B. Casein aufnehmen. Es ist daher wahrscheinlich, daß *Echinodermen* einen nennenswerten Teil ihres Nahrungsbedarfs durch Mikrophagie von gelösten Nahrungsstoffen, Makromolekülen, die im Schleim zurückgehalten werden, und ganz besonders von kleiner Beute und organischen Partikeln, die vom Epidermisschleim und den auswandernden Coelomocyten verdaut werden, decken können. Das ist vielleicht auch der Fall bei vielen anderen mikrophagen Tieren mit bewimperter Körperdecke.

A. Etudes sur le terrain des Echinocardium cordatum de la baie de Seine

I. Distribution et écologie

Les deux seuls endroits où des *Echinocardium cordatum* peuvent être déterrés à marée très basse en Normandie sont les plages sableuses d'Hermanville-Colleville et de Home Varaville, à environ 4 km à l'Ouest et à l'Est de l'embouchure de l'Orne. Les sables y sont constitués en très grande partie de grains de 200 à 500 microns avec 5 à 20 % d'éléments plus fins. Leur teneur en calcaire est de 40 à 60%, vu qu'ils proviennent essentiellement de coquilles de mollusques broyés, avec prépondérance de moules. On trouve toujours un fin dépôt superficiel riche en détriti organiques aux stations de superficie très limitée (une cinquantaine de mètres carrés) où les oursins se rassemblent. Ils ne sont en réalité que les audacieux avant-coureurs d'une population très considérable qui prolifère un peu plus au large face à l'estuaire de l'Orne sous un à dix mètres d'eau. Les géologues LARSONNEUR et HOMMERIL (com. pers.) en ont dragué là de très nombreux échantillons, jusqu'à 5 kms du rivage (Fig. 1 d'après LARSONNEUR). Comme le montre la carte, l'aire de l'espèce s'étend à quelque 35 kms vers le Nord en travers du chenal de la Seine, mais la densité est moins forte dès qu'on s'éloigne des hauts fonds alluviaux.

Cette aire est limitée vers l'est par le défaut de salinité de l'estuaire de la Seine et à l'Ouest par la présence de sables graveleux sans doute impropres à l'implantation des larves. Aucun animal n'a été rencontré audessous de 23 m de fond, ni dans sables littoraux vaseux à Owenia, entre les embouchures de la Dives et de la Touques. Nous devons donc supposer que l'espèce exige des eaux peu profondes bien aérées et de salinité normale reposant sur un sable calcaire assez fin renfermant, au moins en surface, un peu de matières organiques. Lorsque toutes ces conditions optimales sont remplies, des populations denses se développent et s'il arrive qu'elles s'installent tout près d'une plage sablonneuse favorable, elles envoient des avant-postes vers les plus bas niveaux de la zone intercotidale. Ceux-ci sont souvent bien instables sur nos côtes où les coups de vent de N.E., en hiver, déplacent et remodèlent les bancs de sable côtiers, enfouissant ou roulant dans les vagues les audacieux colons. Notons que d'après LARSONNEUR, le bivalve *Pharus legumen* accompagne *Echinocardium C.* dans tous les prélèvements à la drague. Le sable prélevé avec les spécimens côtiers renferme au contraire: *Donax vittatus, Lanice conchilega* et de minuscules *Diogenes pugilator.*

II. Croissance et cycle vital des colonies côtières

a) Observations générales

La fragilité des stations côtières ne facilite pas leur observation d'une année à l'autre. Toutefois, en deux ou trois points favorables déterminés avec précision, j.ai pu suivre pendant quelques années consécutives de petites populations bien identifiées. Les invasions en provenance du large sont très irrégulières: C'est ainsi que pendant l'été 1965, on pouvait déterrer de nombreux individus, à marée basse sur une longueur de 2 km, entre

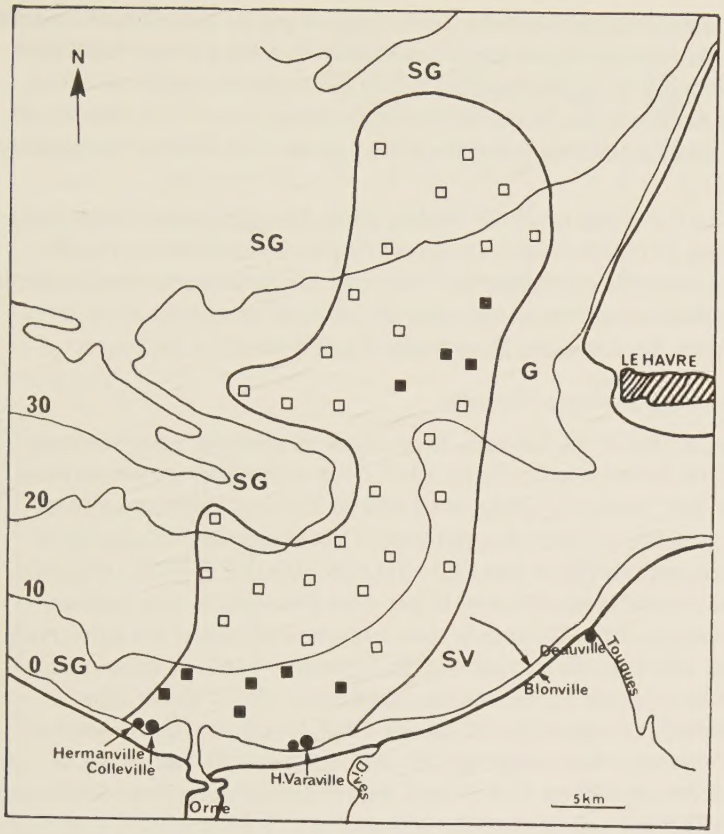


Figure 1. Carte de la Baie de Seine

- • Stations où l'on peut trouver des *Ech. cordatum* à très basse mer
- ▪ Points de dragage où 5 à 30 individus d'*Echinocardium* ont été capturés simultanément
- ▫ Points de dragage où 1 ou 2 échantillons ont été recueillis

S V Sables vaseux *(Owenia)* ——→ Rejet à la côte de centaines de testes blanchis en octobre 1967 (Blonville)

S G Sables graveleux

G Gravier

Figure 1. Map of the Bay of the Seine

- • Stations where *Ech. cordatum* can be dug out at Low Spring tide mark
- ▪ Dredging points where 5 to 30 individuals of *Echinocardium* were captured simultaneously
- ▫ Dredging points where only 1 or 2 samples were taken

S V Muddy sands with *Owenia* ——→ Hundreds of wrecked tests cast into Blonville cove in october 1967

S G Coarse sands with gravel

G Gravel

Colleville et Riva-Bella. Mais tous ces audacieux furent balayés par les tempêtes de l'automne. Depuis lors, les populations restreintes que je pus étudier d'un été à l'autre habitaient surtout un banc de sable stable et de très bas niveau dont j'ai repéré la position exacte à la limite de Colleville et de Riva-Bella. Quand de nouveaux-venus viennent s'y installer, ils s'y présentent, en mars-avril, comme des individus jaune pâle de 22 ± 2 mm sexuellement immatures.

Un an plus tard, on les retrouve avec une belle couleur jaune d'or, des gonades actives et ils ont 37 ± 3 mm de long. Si l'hiver suivant n'a pas été trop rude, on déterrera l'année suivante de gros oursins mordorés approchant de 5 cm, avec des glandes génitales brunâtres mais actives. De tels individus montrent en automne des signes de sénescence et ne survivront pas à un nouvel hiver. En aquarium, ils ne tiennent guère plus de 2 ou 3 mois.

b) Découvertes du banc de Home-Varaville

Sur cette plage, à 3 km W. de Cabourg, sur un banc de sable qui ne se découvre qu'aux fortes marées, il fut trouvé à la fin d'août 1967, deux minuscules individus translucides de 5 et 7 mm de long, auprès de quelques adultes de 32 mm : Récemment métamorphosés, ils avaient dû naître au début du printemps. C'est la première fois que de si jeunes *Echinocardium* étaient trouvés «à sec». En effet H.B. MOORE (1936), en Grande Bretagne, devait tamiser des sables récoltés sous la mer pour découvrir de tels «jeunes» et il en concluait que les animaux recueillis dans la zone intercotidale étaient des immigrants venus de plus bas, ce qui doit être très souvent vrai. En novembre 1967, au même endroit exact, je déterrai 3 nouveaux jeunes qui mesuraient maintenant 12–13 mm et dont la teinte jaune paille commençait à apparaître. En janvier 1968, les marées insuffisantes ne découvrirent pas notre «nursery» mais à son aplomb, dans les laisses de mer, je pus ramasser 5 petits tests à peine dénudés de 15 à 19 mm, auprès de plus gros (longs de 37 mm). A la fin de février 1968, je pus à nouveau accéder à la station et y déterrer avec mes doigts 8 petits oursins de 16 à 20 mm de long que je mis en aquarium. En septembre, la nichée avait atteint dans les 28 ± 2 mm, vivant côte à côte avec des animaux de 43 mm. Finalement, en avril 1969, des étudiants me rapportèrent de cette même station 10 échantillons de 36 ± 2 mm et 3 «gros» de plus de 47 mm. En résumé, j'avais trouvé l'occasion rare de contrôler sur 2 années, en une station bien précise et stable une double population comprenant deux «groupes d'âge». Le premier groupe, éclos en 1967 fut étroitement suivi depuis son état post-larvaire jusqu'à 36 mm, le deuxième, décalé d'une année fut observé depuis la taille initiale de 32 mm jusqu'à 48 mm. Les deux groupes en cohabitation dans une même aire limitée, se distinguaient jusqu'à la fin très nettement, tant par leur moyenne de taille que par la couleur ou l'état sexuel. La table I résume les moyennes de mes mesures successives.

c) Observations sur des populations-épaves (Blonville, Vertbois)

Les échantillons récoltés vivants n'étaient pas assez nombreux pour permettre des calculs statistiques ; mais près de Deauville, en octobre 1967 une tempête rejeta dans la baie de Blonville (flèche fig. 1) plusieurs centaines de tests blanchis dont j'ai ramassé au hasard 500 échantillons. Mesurés au pied à coulisse, je les ai divisé en classes de 1,5 en 1,5 mm. L'histogramme tracé sur la fig. 2 est bien symétrique, étroit et peut s'inscrire dans

Table I

		Août 1967	Nov 1967	Jan 1968	Fev 1968	Sept 1968	Avr 1969
Groupe jeune	Taille (size) mm	6 ± 1	12 ± 1	17 ± 2	19 ± 3	28 ± 3	36 ± 2
	âge (en mois)	3	6	8	9	16	23
Groupe âgé	Taille (size) mm	31 ± 2		37 ± 2		43 ± 2	47 ± 2
	âge (en mois)	16		21		29	36

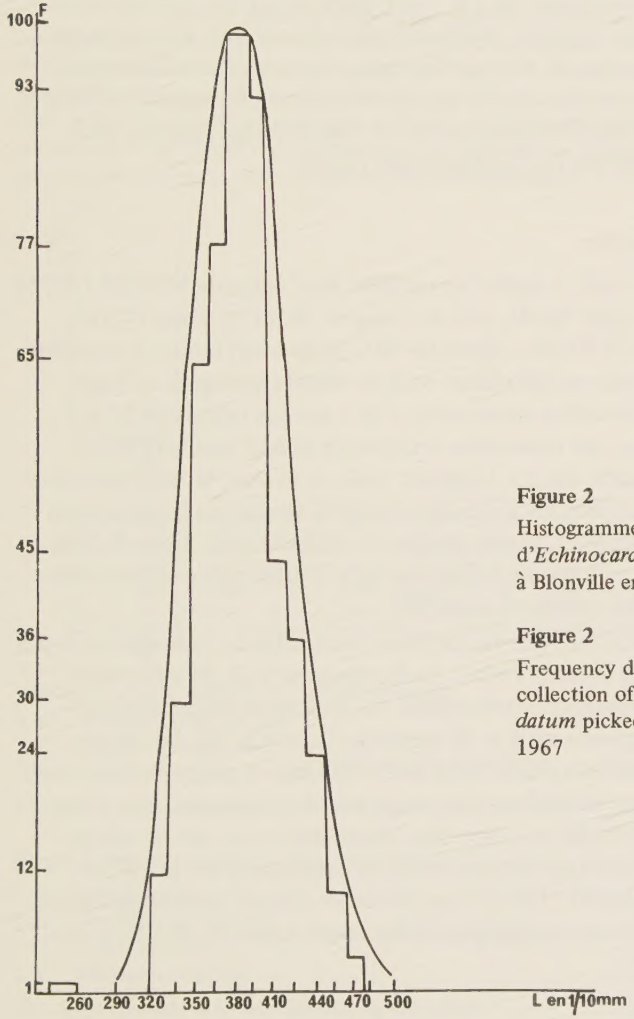


Figure 2

Histogramme Fréquence/taille établi sur 500 tests d'*Echinocardium cordatum* rammassés au hasard à Blonville en octobre 1967

Figure 2

Frequency diagram of the length-groups in a collection of 500 wrecked *Echinocardium cordatum* picked up in Blonville Cove, in october 1967

une courbe de Gauss avec un mode de 39,0 mm et un écart-type calculé de 3,2 mm. Comme aucun échantillon vivant n'a été trouvé sur la grève de Blonville ni même dragué à proximité immédiate, le désastre avait dû résulter de l'action d'une lame de fond sur une population du large remarquablement homogène. La taille moyenne correspondrait à un âge de 28 mois environ, selon les critères de Varaville. Un échantillon unique de 23,2 mm devait provenir d'une autre population de 14 mois moins éprouvée. Il n'y avait aucun vieil individu senescent ni de tout-jeunes individus qui, de toute façon auraient été brisés.

Il est intéressant de comparer cette collection avec les 60 épaves ramassées au hasard, en avril 1969, par mes collègues P. et S. LE GALL à Vertbois (Ile d'Oléron, au nord de Bordeaux). Ce lot est beaucoup plus hétérogène: On distingue un groupe de «petits» s'étageant de 22 à 32 mm avec un maximum de fréquence à 28 mm puis un 2è groupe de «gros» allant de 35 à 52 mm sans maximum de fréquence bien net de sorte qu'on peut imaginer qu'il renferme 2 générations chevauchantes de 2 et 3 ans. Dans ce cas, les «petits» n'auraient qu'un an d'âge. On peut être surpris de leur taille relativement forte (en moyenne 6 mm de plus que leurs contemporains de Normandie) mais, dans le golfe de Gascogne (Biscay), la température moyenne est plus élevée que sur les côtes du Calvados et la saison tempérée y commence plus tôt. Donc l'éclosion des larves doit être plus précoce, plus étalée dans la saison et la croissance est certainement plus rapide ([1]).

d) Comparaisons et conclusions

Mes propres observations sont à mettre en parallèle avec celles de MOORE (1936) à Port Erin (Mer d'Irlande) et à Fairlie Sands, près de Glasgow. Nous trouvons l'un et l'autre ce même cycle de 3–4 ans et Moore a raison (à 90% seulement) lorsqu'il considère que les jeunes adultes trouvés «à sec» au printemps sont de récents immigrés du large. A Port Erin, l'auteur donne comme tailles moyennes à 1 et 2 ans des valeurs de 22 et 35 mm: c'est très comparable à ce que nous avons à Colleville et à ce que BOYSEN-JENSEN (1919) trouve au Danemark, dans le Limfjord. Mais en Ecosse, Moore décrit une croissance plus lente (12 et 23 mm pour les 2 premières années) tandis que je soupçonne les oursins de Gascogne d'atteindre 28 et 39 mm pendant le même temps. Il paraît donc que la durée de l'hiver, beaucoup plus grande à Glasgow qu'à Oléron influe considérablement sur la croissance pendant les 2 premières années.

J'ai d'ailleurs constaté, comme MOORE, que l'activité nutritionnelle des animaux est à peu près nulle audessous de 8 °C. Dans les eaux froides du Northumberland, BUCHANAN (1960) n'a repéré qu'une seule population intercotidale. La croissance est encore plus lente et la maturité sexuelle n'intervient qu'à la 3è année (au lieu de la 2è), les oursins vivant alors 4–5 ans. Mais BUCHANAN étudie aussi méthodiquement pendant 7 ans une population «profonde» encore plus paresseuse dont les individus ne prennent que 3 mm par an. Aucune maturité sexuelle n'a été observée chez ces animaux qui, selon l'auteur vivraient 10 à 15 ans. Des populations encore plus ralenties existeraient sur le «White Bank» de la Mer du Nord, selon URSIN (1960). Il est probable que ces lentes populations stériles sont à la limite de leur domaine écologique: Elles vivent dans des eaux trop pro-

([1]) Voir Addendum N° 1.

fondes, donc peu aérées et relativement froides en été et sur des sédiments limoneux convenant davantage aux *Brissopsis lyrifera* et aux *Echinocardium flavescens,* leurs voisins immédiats.

Les cartes d'URSIN indiquant en certains points du Dogger Bank des populations très prospères, celles-ci doivent produire de grands essaims de larves que les courants entraînent vers des fonds moins favorables où, après métamorphose, elles peuvent produire ces curieuses populations «en survie».

B. Comportement et réactions des Echinocardium en élevage

I. Matériel et méthodes

Les animaux, déterrés à la fourche doivent être touchés le moins possible et amenés rapidement au laboratoire dans du sable humide prélevé sur les lieux. On les maintient en survie prolongée à condition d'assurer dans le sable des bacs d'élevage une importante circulation d'eau de mer aérée. On peut utiliser des récipients à double fond permettant une percolation ascendante, ce qui évite la formation de vase. Il ne faut pas surcharger les bacs; pour les expériences, on peut même utiliser des pots individuels. Pour l'étude du rhéotropisme, j'ai construit un Echinodrome (fig. 3) consistant en un large bac peu profond où le sable repose sur un fond de plexiglass. A une extrémité l'eau pénètre dans le

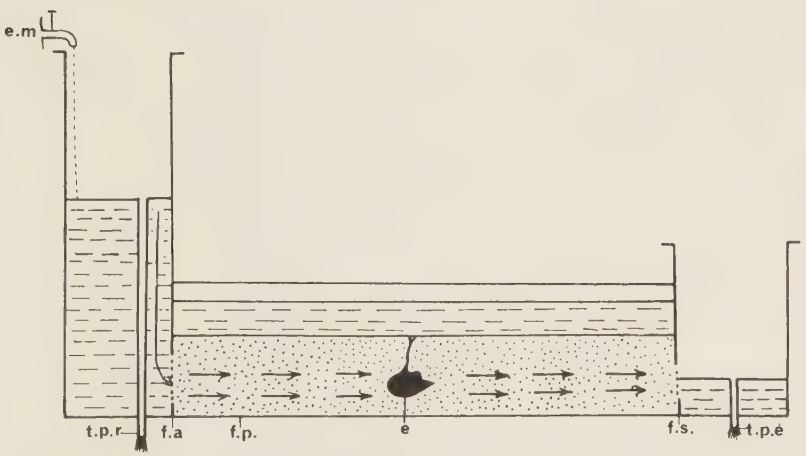


Figure 3. Coupe sagittale de l'«Echinodrome»

e. m: Robinet d'eau de mer
f. a: Fenêtre d'admission
f. s: Fenêtre de sortie
} garnies de soie à plancton
f. p: Fond en plexi-glass
e: *Echinocardium*
t. p. r: Trop-plein du réservoir de pression
t. p. é: Trop-plein du réservoir d'évacuation

Les ponctuations représentent le sable, les tirets l'eau de mer

Figure 3. Sagittal section of the "Echinodrome"

e. m: Sea-water tap
f. a: Admittance window
f. s: Escape window
} Closed with plancton gauze
f. p: Plexi-glass bottom
e: *Echinocardium*
t. p. r: Sliding tube for establishing the water-level in the "pressured admittance tank"
t. p. e: Sliding tube regulating the water level in the escapement tank

The dots represent sand and the dashes, sea-water

sable par une paire de fenêtres garnies de soie à plancton. Elle ressort à l'autre bout par une autre paire de fenêtres semblables, juste en face des précédentes. Ces paires de fenêtres communiquent respectivement avec le réservoir d'admission et le réservoir de sortie. On règle le niveau de l'eau dans ces 2 récipients au moyen de tubes de trop-plein coulissants. On peut ainsi faire varier le niveau de l'eau dans le bac et la vitesse des courants parallèles s'écoulant dans le sable. J'ai utilisé des sables de composition variée, remplaçant même parfois la couche superficielle par de la brique rouge pilée tamisée.

II. L'enfouissement et la locomotion

a) Observations et expériences

Un *Echinocardium* sain et actif doit s'ensabler en moins de 10 min dans un sable saturé d'eau de mer fraîche. Si le sable est parcouru de courants bien déterminés, l'animal s'oriente déjà par rapport à eux avant même son enfouissement complet. Comme l'a bien vu NICHOLS (1958), c'est le piochage des piquants frontaux-latéraux dans le sable meuble qui provoque l'ensevelissement : on les voit au travail dans des récipients à parois transparentes et leur ablation rend l'enfouissement impossible. Par contre, les larges «rames» spatulées du plastron (fig. 4) poussent l'animal en avant. Elles sont ainsi orientées qu'elles

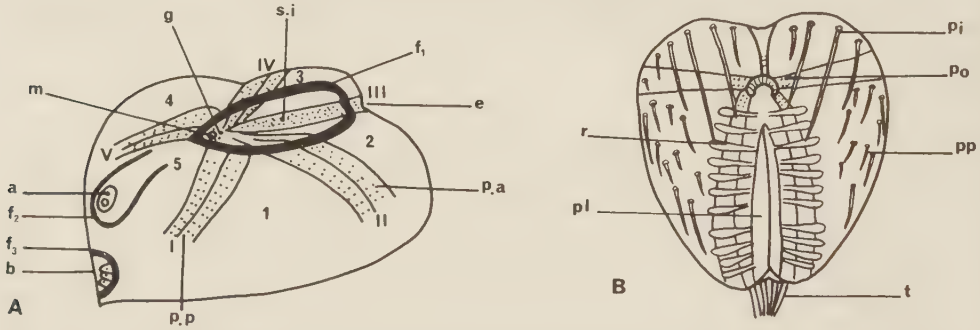


Figure 4. A) Vue de profil d'un test d'*Echinocardium cordatum*

Les chiffres romains indiquent les ambulacres et les chiffres arabes les interambulacres dans la nomenclature de LÓVEN

g: 4 orifices géni taux, si: Sillon impair dorsal, e: Echancrure frontale, pa: Pétales antérieurs, pp: Pétales postérieurs, m: madréporite, f1: Fasciole interne, f2: fasciole anal, f3: fasciole subanal, b: Bouclier subanal, a: anus

B) Schéma montrant la disposition des piquants sur la face orale

pi: Piquants repliés protégeant la bouche, pp: Piquants latéraux piocheurs, t: Touffe sous-anale, r: rames du plastron, pl: Plastron, po: pore des podia pénicillés du floscelle

Figure 4. A) Side view of the test of *Ech. cordatum*

The roman figures show the ambulacra and the ordinary ones the interradii after LÓVEN's system

g: The 4 genital pores, si: odd dorsal furrow, e: frontal notch, pa: anterior petals, pp: posterior petals, m: madreporite, f1: internal fasciole, f2: anal fasciole, f3: subanal fasciole, b: subanal shield, a: anus

B) Diagram of the oralspines

pi: Backward spines of the protecting grid of the mouth, pp: lateral digging spines, r: spatulate "oars" on the plastron, pl: plastron, t: subanal tuft, po: pores of the penicellate podia of the floscelle

tendent aussi à faire remonter l'animal en pente douce. Quand un animal souffre d'anoxie, il remonte souvent à la surface du sable où il progresse rapidement, la partie antérieure un peu relevée. Les piquants antérieurs fouisseurs paralysés par manque d'oxygène, ne travaillent plus. Le degré d'enfouissement d'un animal résulte d'un équilibre entre les effets contraires des piquants qui creusent et des spatules ventrales qui poussent vers le haut. La profondeur réalisée varie beaucoup en fonction des conditions extérieures et peut être de facteurs internes. Dans un aquarium à circulation ascendante rempli de 25 cm de sable, j'avais placé une récolte fraîche d'animaux de 4 cm. Ils s'y enfouirent à 9–10 cm, restant bien repérables par les ouvertures de leurs cheminées aborales. Au bout de plusieurs jours, on ne voyait plus de trous en surface, les animaux avaient tous gagné le fond, se groupant vers le tuyau d'arrivée d'eau ou sur les bords de la cuve où le liquide remontait le plus facilement. Il y avait donc eu un tropisme global tridimensionnel poussant les oursins vers les régions les plus meubles et les plus irriguées.

De même, ayant placé au hasard, dans mon «échinodrome» rempli de 12 cm de sable 6 oursins de 2 cm et réglant l'ouverture des fenêtres de façon à créer 2 courants parallèles à mi-hauteur, les animaux se sont rapidement enfouis mais sans atteindre le fond de plexiglas. Au bout de plusieurs heures, ils étaient tous dans l'axe des 2 courants, à mi-profondeur, c'est-à-dire là où le sable était le mieux irrigué. Si le courant d'eau dans l'appareil est modéré, les animaux le remontent. Si l'on provoque au contraire un flux rapide, les oursins fuient le courant, atteignant alors le fond de plexiglass à travers lequel on peut suivre leur trajectoire dessinée par les longs sillages rectilignes de mucus partant de leurs fascioles subanaux (les prétendus «sanitary drains» de NICHOLS (1959b)).

BUCHANAN (1966) remarque que les oursins de sa population «offshore» sont moins enfouis que ceux d'une population côtière près de Cullercoates. Celà tient sans doute à ce que les premiers, peu actifs vivent sur des sédiments compacts et peu aérés sous une eau assez profonde. Sans doute, l'auteur fait-il remarquer qu'en aquarium ces animaux restent peu enfoncés, mais le dragage et le transport sont néfastes à ces fragiles animaux et la moindre altération de leur état se traduit toujours par des difficultés d'enfouissement.

b) Explication possible des rhéotropismes observés

L'orientation rhéotropique constatée peut ainsi s'expliquer: Si un courant modére d'eau aérée frappe le front du test du côté gauche, par exemple, les piquants de ce côté travaillant dans un sable ameubli et bien oxygéné seront activés et feront pivoter l'animal vers la gauche jusqu'à ce que le courant vienne le frapper symétriquement de face. Les piquants des deux côtés alors également favorisés font alors progresser l'oursin tout droit à contre-courant.

Mais si l'on produit un courant intense, comment expliquer le renversement du tropisme? La fuite rapide observée suppose une forte activité des rames ventrales mais celles-ci ne peuvent agir qu'en agissant sur un sable assez compact, or un courant fort, frappant le test de côté y provoque un affouillement dans le sable emêchant les spatules de ce côté de prendre appui, les spatules du côté opposé continuant de fonctionner: l'animal pivote alors jusqu'à recevoir le courant sur l'arrière, courant dont la pression favorisera une progression rectiligne suivant son axe.

En réglant le débit de mon «échinodrome» à une valeur convenable et plaçant 6 oursins très comparables vers le centre, j'ai pu observer, 2 jours après que 3 d'entre eux avaient gagné les fenêtres d'admission, les autres se trouvant à l'opposé, près des fenêtres de fuite. Il y a donc un point sensible, variable selon les individus où le tropisme s'inverse. Peut être aussi peut-on supposer qu'un courant assez rapide frottant sur les piquants ait un effet inhibiteur, l'oxygène étant au contraire activateur: selon la vitesse de l'eau et son oxygénation, un des effets l'emporte sur l'autre, le point d'équilibre instable entre ces 2 actions contraires pouvant varier chez les divers individus.

L'influence prépondérante des courants sur l'orientation des oursins irréguliers semble se retrouver chez d'autres spatangoïdes: FREDJ (com. pers.) a observé dans ses plongées à Monaco, que des files de *Spatangus purpureus* dessinent les lignes de courant sur le fonds marin.

c) Autres actions que le rhéotropisme

Dans des récipients où aucun courant horizontal n'est établi il est possible d'observer l'action d'autres facteurs sur les déplacements. En été, à certaines périodes, il arrive que quelques oursins s'approchent de la surface au point que les extrémités des plus longs piquants de la crête dorsale se dressent à l'extérieur autour d'un large trou ouvrant directement dans le sillon impair. Il peut arriver, que le lendemain, sans raison apparente, ces mêmes animaux soient de nouveau enfouis de quelques centimètres. Celà s'observe aussi assez rarement, en été, sur le terrain, ce qui facilite le repérage et la capture de ces imprudents. Je n'ai pas encore élucidé la raison de ces stages temporaires près de la surface. S'agirait-il de causes organiques internes en rapport, peut-être, avec la ponte ? Nous verrons aussi (B. IV) que les animaux en équilibre par rapport aux courants présentent un chimiotropisme positif vis-à-vis de matériaux organiques alimentaires déposés sur le sable. Il s'exerce par l'intermédiaire de ces podia dorsaux qui creusent la «cheminée» en direction de l'aliment sous lequel l'animal s'immobilisera pour effectuer son travail d'affouillement nutritif.

d) Explication des immigrations littorales

En conclusion, l'étude expérimentale de ces comportements nous permet de mieux comprendre comment s'établissent ces petites populations groupées de la zone intercotidale inférieure: Sur les plages sableuses et plates où les vagues déferlent très loin, l'eau projetée sur le rivage retourne vers le large en ruisselets bien visibles à marée basse. Des courants se forment ainsi dans les dépressions ensablées jusque sous la mer. S'ils aboutissent à des bancs peuplés d'*Echinocardium* ceux-ci vont être incités par leur rhéotropisme à remonter ces chenaux vers des bancs de sable littoraux avancés riches en dépôts organiques et recouverts d'une eau très aérée.

Mais si les animaux tendent à remonter plus haut, ils risquent alors d'être malmenés par le déferlement des vagues ou de subir des émersions trop prolongées et mortelles: En effet, lorsque dans mon «échinodrome», je réalise les conditions de la basse mer pendant plusieurs heures, le sable se tasse, les cheminées dorsales, plus visibles, se dilatent et l'air gazeux viendra en contact direct avec l'oursin. Si la situation se prolonge un peu trop, l'air pénètre dans le tube digestif et quand on rétablit un niveau d'eau convenable, on peut voir l'animal venir affleurer puis flotter pour mourir quelques heures plus tard.

III. Le mucus et son cycle

Depuis CUENOT (1912) il est d'usage de parler du «terrier» d'un *Echinocardium*. En fait, il n'existe pas de «loge» indépendante de l'animal ni de galeries «plastered with mucus» (NICHOLS, 1959 a et b). Il n'y a qu'un «cocon» muqueux emporté avec lui par l'oursin en mouvement et laissant en arrière de la touffe sous-anale, comme un sillage, cette mèche visqueuse appelée par NICHOLS le «sanitary drain». Une autre mèche s'étire au-dessus de la crête de piquants aboraux et des clavules: c'est là que s'agitent les podia très extensiles du sillon impair pour atteindre la surface du sable où apparait un trou entouré d'une légère dépression. Ce drain muqueux donne l'impression d'un véritable conduit consolidé lorsque le sable mis à sec se rétracte, à marée basse. Cette rétractation peut aussi décoller de l'oursin son capuchon visqueux, si bien que les animaux récoltés à sec, à la fourche sont parfaitement propres, d'un jaune vif. Ce sont ces observations, qui ont donné la fausse idée d'un terrier avec son schnorchel et son égout. Mais dans un sable imprégné d'eau, le caractère fluide de ces annexes apparaît et quand on retire un oursin de l'aquarium, à sable, il apparaît coiffé jusqu'à l'ambitus d'une calotte visqueuse et sale recouvrant les piquants aplatis de la face aborale. Sur les bords où sont insérés les piquants qui piochent verticalement, le mucus devient plus clair et fluide; il va rejoindre la poche semi-liquide non ensablée qui entoure la bouche défendue par les buissons de podia pénicillés du floscelle et par les piquants oscillants rabattus sous la région orale.

Le mucus est produit par tout l'épiderme, et en particulier par les digitations des podia pénicillés (NICHOLS, 1959a) mais si on examine la reconstitution du mucus sur un animal lavé, on voit que la plus forte production apparaît au niveau des fascioles. Les puissantes bandes ciliées des clavules repoussent du mucus poisseux à la surface des piquants aboraux. Les têtes des clavules sont de véritables poches sécrétrices qui donnent une métachromasie violette avec le bleu de toluidine et sont bourrées des 4 types de coelomocytes granuleux (PÉQUIGNAT, 1966b). La fig. 5 indique les déplacements du mucus qu'on peut matérialiser par du carmin en poudre, du sable fin ou de l'aquadag. On peut aussi élever des *Echinocardium* dans une culture de phytoflagellés colorés, très vite agglutinés par le mucus. Celui-ci est très abondant dans l'aire circonscrite par le fasciole interne. Il se forme au centre du sillon impair un étroit cordon muqueux qui descend en avant en direction de la bouche, mais le grand excès du liquide poisseux chargé de grains, de sable et de particules organiques trop grosses est refoulé latéralement par les piquants bordant l'encoche frontale autour des bosses antérieures du test. Là, le mucus est «peigné» vers l'arrière par les ondulations des piquants aplatis de la face aborale. Le mucus ainsi étiré en un voile élastique

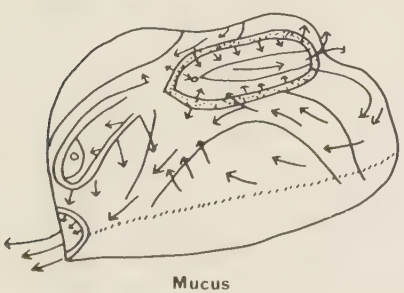


Figure 5

Courants de mucus s'établissant dans le capuchon visqueux d'un *Ech. cordatum.* se reconstituant après lavage. La production de mucus est surtout abondante au niveau des fascioles

Figure 5

The mucus streams in the slimy cap of an *Ech. cordatum* which reapperars after washing. The main production of mucus comes out from the fascioles

tend à remonter vers l'apex avant de retomber le long des pétales postérieurs, s'enrichissant au passage des secrétions des fascioles anaux et subanaux et c'est ainsi que s'étire derrière le test, à partir de la touffe de piquants postérieure ce sillage filant dit «sanitary drain» (fig. 5). Ce nom, donné par NICHOLS convient assez mal, vu qu'il résulte surtout du peignage superficiel du test et fort peu des rares produits de rejet de l'anus, qui consistent en des grains de sables parfaitement propres (LAFFON, 1951). Latéralement, au niveau de l'ambitus, le voile visqueux semble s'effilocher le long des piquants fouisseurs: le mucus, plus fluide s'écoule suivant les cannelures des piquants vers cette bulle claire périorale où s'activent les podia floscellaires dont les nombreux boutons produisent aussi du mucus et laissent échapper de nombreux coelomocytes jaunes (xanthocytes, PEQUIGNAT, 1966b). Dans la nature, les oursins s'orientent face aux courants d'eau sous-aréniens: L'eau chargée d'oxygène imbibe d'abord ce mucus oral, le surplus s'évacuant par le «sanitary drain». Cette eau d'imbibition peut remonter sous la calotte visqueuse aborale, – qu'elle soulève parfois – en empruntant les ambulacres antérieurs pairs (fig. 6). Dans ces pétales, le flux de l'eau et du mucus seraient donc centripètes: Cela est confirmé par l'expérience: si l'on implante au milieu d'un pétale antérieur des cristaux de l-leucine et de ninhydrine, les piquants voisins se colorent rapidement en violet, mais dans l'heure qui suit, la coloration se propage vers l'apex – comme le font des grains de carmin ou de carbone placés de la même façon. Ces courants se comprennent fort bien en considérant la morphologie des piquants: Ceux-ci sont aplatis en serpes recourbées vers l'arrière. Leur ciliature est centrifuge, leurs mouvements se propagent en ondulations partant de la région frontale: Forme et fonction se correspondent. Ceci est en contradiction avec la théorie de NICHOLS selon laquelle le drain apical serait un «respiratory funnel» dans lequel l'eau superficielle descendrait pour se répartir en divergeant le long des 4 pétales. L'auteur se base sur le fait que des grains de carmin déposés sur l'entonnoir extérieur se retrouvent ensuite sur les pétales. J'ai expérimenté de mon côté avec des pots individuels où la couche de sable superficielle était remplacée par de la brique rouge pilée. Deux jours plus tard, après mise à sec et exhumation latérale, je constatai une forte proportion de brique dans la «cheminée» (assez oblique par rapport au plan de symétrie) ainsi que dans le sillon impair jusqu'au delà de l'échancrure. Des traînées rougeâtres bordaient la calotte muqueuse autour des bosses frontales et des grains de brique remontaient sur les pétales antérieurs sans cependant atteindre l'apex. Un ou deux morceaux un peu gros se retrouvaient sous le plastron et, dans le tube digestif, seul l'oesophage montrait quelques petits grains rouges très fins. Celà montre que les matières granuleuses captées en surface par les podia passent par le tunnel

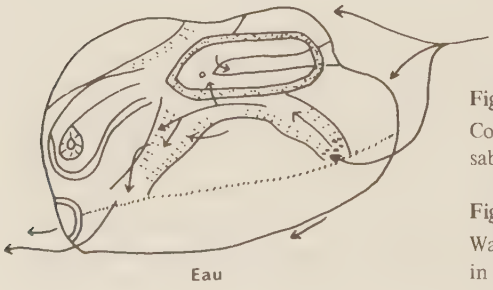


Figure 6
Courants d'eau sur le test d'un *Echinocardium* dans un sable irrigué

Figure 6
Water-streams on the test of an *Echinocardium* cordatum in irrigeted sand

dorsal et après avoir débordé l'échancrure frontale suivent bien les trajets que j'ai schématisés (fig. 5). Il est probable que, dans l'expérience de NICHOLS, les grains de carmin retrouvés par l'auteur sur les pétales avaient dû y parvenir, par un trajet indirect, remontant en arrière après avoir débordé l'encoche frontale.

IV. Comportement alimentaire des Echinocardium

a) Activité prédatrice des podia et leur déterminisme

Ce qui précède nous porte à douter du rôle respiratoire du «funnel». Selon NICHOLS (op. cit.) l'édification de ce drain apical représente un effort désespéré vers l'oxygène. En fait, c'est surtout quand les animaux sont actifs et bien irrigués qu'ils manoeuvrent leurs podia dorsaux, se déplacent et creusent leurs «cheminées» successives. En cas d'anoxie (stagnation de l'eau dans le bac), ils tendent à venir en surface ou, faute d'y accéder, meurent sur place sans se manifester. Jamais je n'ai constaté d'hyperactivité podiale en réponse à un défaut d'oxygène alors que celle-ci exige au contraire une bonne oxygénation. Quand la température de l'eau descend au-dessous de 8 °C, comme sur nos côtes en février, l'activité podiale cesse. On ne constate pas d'ailleurs de courant liquide permanent et descendant dans la cheminée. Un tel courant serait contraire aux mouvements ciliaires centrifuges des clavules et des piquants. Il y aurait plutôt un courant ascendant, poussant le mucus vers l'extérieur. Si des particules superficielles sont entraînées vers le tunnel apical, c'est par la rétractation brusque des podia digités qui, après avoir capturé des matières organiques en surface, provoquent un éboulement sableux à l'entrée de la cheminée. La petite dépression qui entoure cet orifice est un véritable piège pour les particules légères et de petites proies animales ou végétales. J'ai récemment observé un minuscule *Diogenes pugilator* qui, tombé dans l'entonnoir et pris à partie par les podia eut bien du mal à se dégager. Mais des proies moins agiles et plus faibles, et des fragments inertes (petits annélides, muscles de moule ou de crustacés, miettes de gruyère) sont capturés et entraînés par les oursins en période d'activité, en bonne santé et bien irrigués. J'ai même vu des animaux venir à bout de proies relativement grosses: Si celle-ci est friable, les digitations articulées des podia dorsaux en arrachent de petits fragments. Si elle résiste elle peut être tirée par un angle à l'entrée de la cheminée où, au contact du mucus, elle peut commencer à se ramollir ou à s'étirer. Parfois, les podia s'affairent autour d'un morceau encombrant, aggrondissant l'entonnoir au fond duquel il va s'embourber. Quand un oursin actif est ainsi occupé autour d'une proie, il se déplace peu, le tropisme chimio-alimentaire prédominant. Dans un pot d'élevage individuel à circulation ascendante plein de sable blanc de Fontainebleau, je déposai dans un angle de la brique pilée triturée avec une moule écrasée et séchée. L'oursin en expérience dont l'entonnoir s'ouvrait à une certaine distance de la zone maculée ne tarda pas à ouvrir une nouvelle cheminée dans la tache de brique. Celle-ci ne cessa de fonctionner pendant les jours suivants. Dans les périodes où les *Echinocardium* viennent affleurer en surface par le bout de leur touffe apicale, il est curieux de voir les podia dorsaux s'allonger horizontalement pour aller capter à la surface du sable des particules organiques jusqu'à 6–7 cm de l'orifice. BUCHANAN (1966) a fait des observations analogues et conclut, comme l'ancien auteur ROBERTSON (1871) et contrairement à NICHOLS au rôle alimentaire des podia dorsaux.

b) Acheminement des aliments capturés

Les proies «tractées» par les podia digités aboutissent nécessairement, mélangées de sable et de mucus dans ce tunnel formé par les longs piquants croisés de la crête apicale au-dessus du sillon impair.

Cette mixture y progresse en avant sur le «tapis roulant» de petits piquants spatulés garnissant le sillon (BUCHANAN, 1966 – PEQUIGNAT, 1966 a). Tandis que les plus fines particules plus ou moins solubilisées et prédigérées (voir chap. suivant) s'intègrent à cet étroit cordon de mucus qui descend dans le sillon antérieur vers la bouche, les fragments trop gros ou peu digestes sont triés par les touffes de piquants bordant l'encoche frontale et sont rejetés avec l'excès du mucus dans ce capuchon poisseux recouvrant le test. Une expérience intéressante matérialise ces cheminements: J'ai élevé un *Echinocardium* dans une culture aérée d'une chlamydomonadale marine, à 4 flagelles et gros stigma postérieur. Au bout de 48 h, la solution primitivement vert clair s'était décolorée tandis que l'animal portait un capuchon muqueux vert pâle, plus foncé sur sa frange ambitale et se prolongeant en une queue subanale vert foncé. Une bave vert mousse occupait aussi le fond du sillon dorsal et colorait le petit cordon muqueux du sillon frontal. Quelques particules vert-sombre étaient aussi en contact avec les podia péribuccaux. Au microscope, on voyait dans le mucus vert clair du capuchon une quantité de flagellés verts agglutinés, certains déformés par allongement et disposés en files immobiles alors que d'autres presque intacts remuaient encore. Au contraire, dans la bave foncée du fond des sillons ou de la queue subanale, on voyait, à côté de cellules immobilisées mais encore en bon état de nombreuses autres désorganisées; parfois la chlorophylle avait disparu alors que la tache caroténoïde du stigma persistait. Il semblait donc qu'à travers les membranes pectiques plus ou moins attaquées, les protéines du cytoplasme et du chromatophore avaient été détruites.

Ceci démontre bien l'action lytique des sécrétions épidermiques sur les cellules capturées par le mucus. Sur les cellules végétales protégées par des membranes glucidiques, l'action est relativement lente mais, comme nous le verrons (chap. suivant) les tissus animaux et les parcelles organiques mortes sont beaucoup plus vite liquéfiées et, dans le cocon fluide péribuccal n'aboutit finalement que de fines particules ou des substances organiques dissoutes. Pour NICHOLS (op. cit.), la cheminée «alimentaire» étant «respiratoire», la nutrition de l'oursin s'effectue par une capture de petites proies par les podia péribuccaux qui les porteraient dans la bouche. En fait, l'observation d'animaux actifs en récipients transparents ne m'a jamais montré de podia buccaux assez extensiles pour transférer des particules dans la cavité buccale, comme on le voit chez les ophiures, par exemple. Les buissons de podia floscellaires, hérissés de petits boutons poisseux libérant de nombreux coelomocytes sont placés en sentinelles à l'origine des 5 ambulacres, et en collaboration avec les «grillages» de piquants, les batteries de pédicellaires arrêtent toute particule un peu grosse ou tout intrus indésirable: La bulle de mucus buccal n'admet ainsi que de très fines particules plus ou moins prédigérées. L'oesophage a un épais épithélium glanduleux; il est envahi de coelomocytes qui lui donnent une teinte rouge; il doit contribuer à digérer et absorber des particules non complètement attaquées auparavant. Par contre, l'examen du contenu du tube digestif ultérieur ne laisse voir que des grains de sable, entre 50 et 300 μ, sans aucune parcelle organique en dehors de quelques fragments de cœlomocytes.

Celà explique les résultats analytiques de LAFON (1953) qui dans le contenu intestinal des *Echinocardium* de Colleville ne trouvait que des traces à peine mesurables d'azote organique. On en vient tout naturellement à concevoir la nutrition des *Echinocardium* comme une microphagie aux dépens du limon superficiel, dont les éléments organiques sont en grande partie digérés au niveau du sillon impair et dans la région péribuccale. Le tube digestif n'a plus guère d'autre rôle que d'absorber avec de fins grains de sable inertes des liquides nutritifs (empruntant au besoin les 2 siphons latéraux) afin d'apporter aux glandes génitales les matières organiques solubles et l'oxygène nécessaire à leur métabolisme. Par contre, les tissus externes peuvent sans doute absorber directement leur nourriture dans ce mucus épidermique, riche en matières organiques dissoutes et qui s'écoule dans les fines rainures des piquants. C'est ainsi que je suis parvenu à cette notion de digestion et d'absorption dermique que l'on va étudier de plus près tant chez les spatangoides que chez les autres échinodermes dans les chapitres suivants.

C. Constatations directes de la digestion cutanée

I. Méthodes

Mes premières observations à ce sujet ont foit l'objet d'un article de «Nature» (PEQUIGNAT, 1966a) mais de nouvelles précisions sont nécessaires. Les expériences décrites sont aisément reproductibles mais à condition de respecter strictement les principes suivants:

1°) Opérer sur des animaux fraîchement récoltés, sains et actifs, de préférence pendant la saison favorable, maintenus avant et pendant les expériences en eau de mer renouvelée, aérée abondamment.

2°) Choisir des particules ou des proies de petite taille, digestes, d'imprégnation facile et présentant une grande surface d'attaque par rapport à leur masse.

3°) Veiller à ce que les proies excitent les piquants qui se ferment sur elles, maintenir un contact permanent avec le mucus, les podia, les clavules en suivant la marche du phénomène sous le binoculaire pendant tout le temps indispensable.

Eviter l'échauffement dû aux lampes d'éclairage et ne pas laisser les tissus cutanés à sec même si l'animal n'est pas complètement immergé – pour éviter la dilution du mucus. Disposer d'un microscope pour suivre la décomposition progressive des proies sur des préparations extemporanées en eau de mer.

II. Expériences sur Echinocardium cordatum

L'activité de l'animal se reconnaît à sa rapidité d'enfouissement, à la mobilité de ses piquants, à l'aspect rosé des zones fasciolaires, aux manifestations de ses podia dorsaux. On peut opérer dans des cristallisoirs d'eau de mer très aérée avec ou sans enfouissement partiel dans du sable propre. Enlever le moins possible de mucus. Les proies les plus rapidement détruites sont: Les planaires, les petits annélides du sable, de très petits amphipodes ou isopodes (Jaera). On utilise aussi des fragments de moule, de muscle de crabe, des miettes de gruyère ou de pain, des lamelles de gélose ou de gélatine non tannée.

Certaines de ces proies peuvent être imprégnées de ninhydrine: En fin de digestion, elles prennent une teinte sépia tandis que les piquants, podia ou clavules les plus proches

prennent une couleur mauve ou violette affectant principalement le tissu conjonctif et les cœlomocytes en dégénérescence. Les régions où la digestion apparaît la plus rapide sont le fasciole interne et le sillon dorsal, surtout dans sa partie antérieure. Là, il présente un surcreusement où les aliments utiles, peuvent séjourner temporairement, retenus par les podia dorsaux et les clavules de la bandelette transversale du fasciole interne. Les petits annélides maintenus à cet endroit peuvent être lysés en une heure. Ils ralentissent très vite leurs mouvements tandis que des ponctuations blanchâtres se forment sous la peau et que le contenu du tube digestif apparaît nettement par transparence. Les vaisseaux sanguins détruits laissent alors diffuser le sang mais bientôt, le corps ramolli, méconnaissable se fond progressivement dans le mucus ambiant, laissant intactes des touffes de soies. Les petits crustacés à mince cuticule sont dissous intérieurement de la même façon: Un minuscule pagure (*Diogenes pugilator*) a son mince abdomen très rapidement détruit si l'on maintient l'animal dans la partie antérieure du sillon dorsal de l'oursin. La décomposition atteint ensuite l'intérieur du céphalothorax dont la carapace résiste. Les crustacés attaqués laissent ainsi une sorte d'exuvie ramollie et transparente qui finit par se dissocier au contact des piquants. Cette dispersion paraît due à une décalcification et à une digestion des protéïnes cuticulaires car nous verrons (chap. suivant) que la recherche des chitinases dans le mucus a donné des résultats parfaitement négatifs. Les petits fragments de muscle de crabe sont un matériel intéressant car on peut y suivre, au microscope, la désintégration progressive et rapide des sarcostyles. La disparition de la striation, s'accompagne d'un envahissement de cœlomocytes dissociés. Il reste parfois des lignes transversales de granules foncés au niveau des membranes Z. Rappelons que tout objet un peu gros est rejeté au passage de l'encoche frontale. On peut s'opposer à cette expulsion en retenant la proie dans le sillon avec un mince fil de nylon rattaché en arrière à un gros piquant. C'est en faisant ainsi «macérer» un morceau de ver imprégné d'antibiotiques et d'antifungiques que j'ai montré (Nature, op. cit) que la digestion cutanée n'est pas le fait de micro-organismes. L'épiderme d'un oursin vivant est remarquablement «propre» et les rares commensaux qui s'en approchent appartiennent à des espèces bien déterminées sans doute adaptées à l'action corrosive du mucus: Le bivalve *Montacuta,* 2 ou 3 copépodes et 2 ou 3 ciliés dont un *Urceolaria* non signalé en Europe mais qui semble au premier examen identique à cet *Urceolaria spinicola* décrit par BEERS (1966) sur les *Stronglylocentrotus droebachensis* du Canada. La digestion cutanée est donc pour l'épiderme fragile de l'échinoderme une arme chimique défensive encore plus efficace que les pédicellaires: Chez les *Echinocardium* de Normandie, les globifères venimeux sont très rares et localisés près de la bouche. Quant aux autres pédicellaires qui agissent à 3 niveaus différents: Tridactyles, puis ophicéphales, puis trofiliés, on les voit se transmettre et triturer les parcelles organiques que la «Digestion cutanée» achèvera de faire disparaître.

III. Expériences sur Psammechinus miliaris

Je fus surpris de constater que cet oursin régulier, vorace et à première vue non microphage constituait un matériel encore meilleur que les spatangoïdes pour étudier les phénomènes de prédigestion. Quiconque élève ces animaux en aquarium ne peut qu'être frappé par tout ce qu'ils retiennent sur leur test avec leurs podia tendus: Coquilles de

bivalves nettoyées de leur cuticule de conchyoline, friables, ébréchées sur leurs bords en contact avec le test ; pattes de crustacés vidées de leur musculature ; frondes d'algues baveuses et déchiquetées dont les bryozoaires encroûtants sont à demi dissous ; cailloux parfaitement nettoyés. Il m'est arrivé de trouver sur le «dos» d'un oursin de petites coquilles de gastropodes entièrement vidées dont les occupants étaient bien vivants quelques heures auparavant (*Rissoa, Natica*). Je fus donc amené à entreprendre des expériences analogues à celles effectuées sur *Echinocardium*. Là encore, les petits annélides et crustacés, du muscle de crabe, des fragments de mollusques, les éponges et les bryozoaires constituent le meilleur matériel. Les oursins actifs, «grimpants», bien pigmentés sont placés 2 ou 3 jours en eau courante rapide avant les expériences sous le binoculaire. Les petites proies organiques excitent les pédicellaires, podia et piquants : Ceux-ci par leur rapprochement convergent peuvent enfermer la parcelle capturée qui s'imprègne de mucus puis de cœlomocytes émigrés rougeâtres. Tandis que la «digestion» se poursuit, on peut, sur un piquant voisin observer l'apparition de petits points rouges bien alignés sur les cannelures.

Au microscope, on voit que celles-ci sont en fait d'étroits sillons (25–35 μ) entre deux minces rebords légèrement épineux. Au fond des sillons, se déplace lentement (grâce à la ciliature épidermique) de fins cordons de mucus chargés de granules divers : Minuscules grains sableux, spicules d'éponges, frustules vides de diatomées. C'est là que l'on voit se dégager par diapédèse les cœlomocytes rouges (rubocytes) et blancs (morocytes) qui sortent nombreux. Le mucus aboutit finalement au bout du piquant où il se détache et tombe. Quand un animal est laissé quelque temps en cristallisoir, on trouve sur le fond de petits flocons grisâtres constitués de granules inertes englués (très différents des bols fécaux en ballonnets) et qui sont les «pleurs» des piquants. Ces observations inédites mènent à penser que les derniers stades de la digestion externe et l'absorption cutanée pourraient s'effectuer pour une bonne part à la surface des piquants, dans ces chenaux muqueux. Nous verrons que l'autoradiographie (fig. 12 et 13) confirme cette manière de voir. Mais les podia ont aussi d'actives sécrétions sur leurs disques : Déposés en chambre humide sur une plaque orthochromatique noire, développée, la gélatine argentique est dissoute en des endroits précis (PEQUIGNAT, 1966 b, pl. I, fig. 2). On obtient des cercles diffusants non colorables à l'iode en plaçant des disques podiaux sur des lames de verre à film d'amidon (technique de DAOUST, 1964). Les sécrétions podiales sont acides (environ pH 5.8 au papier Merck).

La digestion dermique des algues paraît beaucoup plus laborieuse que celle des tissus animaux. La cuticule vernie des laminaires, ulves et *Rhodhymenia* résiste alors que l'attaque se perçoit sur les bords déchiquetés ou autour des trous faits par les piquants. On conçoit comment tous les objets dont se coiffent les *Psammechinus* peuvent contribuer à la nutrition de l'animal. Celà doit-il nous faire négliger le rôle de la lanterne d'Aristote et de ses annexes? Certes non : Les actions corrosives observées aboralement sont encore plus intenses sur la face orale aplatie contre le support, avec sa foule compacte de piquants trapus, de podia très serrés et ses pédicellaires nombreux – et sa bouche. A Luc-sur-mer, on trouve souvent de petits *Psammechinus* collés sous des dalles calcaires perforées de *Polydora*. Alors que la surface inférieure des dalles est toute barbouillée de matières organiques, d'animaux ou d'algues incrustants et taraudants, la plage circulaire que laisse

l'oursin arraché est parfaitement propre. Celà est à rapprocher des empreintes obtenues au laboratoire sur des fonds de boîte de Pétri incrustées de gélatine ou de blanc d'oeuf. La digestion s'effectue sur toute la surface de contact. La lanterne apparaît alors comme un pédicellaire géant brisant les obstacles durs; nous avons pu la voir craquer les valves assez coriaces d'un *Donax* de 15 mm dont les tissus mous déjà prédigérés partiellement formaient une mèche visqueuse entre l'intérieur des valves et la bouche de l'oursin. C'est que l'espace compris entre la membrane péristomienne et le support est une véritable poche digestive où les prétendues «branchies» fortement ciliées sécrétent du mucus et relâchent de nombreux cœlomocytes auxquels elles doivent leur couleur. Il en est de même des lèvres rouges avec leurs hautes cellules glandulaires colorables au bleu alcian acétique. D'autre part, à la base de la lanterne, en position radiale, existent des poches bien représentées par STOTT (1955) sur *Ech. esculentus*. Ayant pratiqué des coupes in toto de *Psammechinus* centimétriques décalcifiés, j'ai pu remarquer dans ces poches des «plaques» épaissies formées de hautes cellules bleu alcian-positives.

Or, si l'on examine un oursin à l'envers dont la lanterne est en action, on aperçoit entre les dents 5 petits ballonnets qui représentent les poches buccales retournées. Au total, toutes sortes de sécrétions viennent converger sur l'aliment, «brouté» avant même que ses débris ne soient aspirés par la puissante ciliature pharyngienne. Dans ce pharynx nous avons retrouvé dans l'épais épithélium à 5 gouttières les cellules glanduleuses à gros granules de 2 types décrites par HOLLAND et al. (1964) renfermant des mucopolyssaccharides neutres (PAS +) et acides (Bleu alcian +). Il est donc probable que la digestion buccale se continue dans le pharynx, entre les mâchoires, et dans l'oesophage avec ses hautes cellules granuleuses entre lesquelles cheminent de nombreux cœlomocytes rouges: Tout celà dérive du même principe: Action combinée d'un mucus cellulaire (ectodermique) et de cœlomocytes émigrés d'origine mésenchymateuse, ces fonctions étant plus développées, concentrées sur des organes spécialisés dans la région périorale et stomodaeale.

Les travaux de FARMANFARMAIAN et PHILLIPS (1962) portant sur la digestion d'algues radioactives ingérées par *Strongylocentrotus purpuratus* montrent que la digestion s'effectuait dans les premières heures avant que les aliments n'aient atteint la troisième boucle de l'«estomac» (intestin antérieur). En fait cet estomac a sa paroi interne formée de hautes cellules ciliées pleines de vacuoles teintées par un pigment jaune-brun soluble dans l'alcool et, d'après les mesures de radioactivité faites par les auteurs, elles auraient surtout un rôle d'absorption et de mise en réserve (confirmé par les variations de masse de l'estomac en fonction du régime). S'il y a encore digestion visible dans les deux premières boucles stomacales, c'est que les fragments d'algue continuent à y être attaqués par les sécrétions dont ils étaient imbibés à leur sortie de l'oesophage. Quand un oursin se met à brouter intensément des laminaires, par exemple, la circulation alimentaire est rapide et les morceaux ressortent à l'anus à peine attaqués. Ils peuvent alors être repris par les piquants aboraux. Il n'y a ni discontinuité ni opposition entre la nutrition «classique» et la nutrition cutanée et la partie endodermique du tractus digestif, outre ses fonctions de réserve doit avoir pour rôle essentiel d'apporter aux glandes génitales contiguës les substances solubles – et l'oxygène – dont elles ont besoin. L'on comprend mieux ainsi le rôle du siphon, ce court circuit qui empêche le blocage hydrique du tube digestif quand des morceaux indigérables encombrent «l'estomac».

IV. Observations sur des astérides

Tout le monde connaît la théorie de SCHIEMENZ selon laquelle les étoiles de mer ouvrent les bivalves à la suite d'une victoire sportive sur les muscles adducteurs de leur proie. On voit sur les dessins des astéries arc-boutées sur les moules sur lesquelles elles sont censées exercer une quintuple traction divergente. J'ai vu maintes fois des *Asterias rubens* «se mettre en cloche» autour d'une moule mais on n'observe pas de traction divergente: Au contraire, les bras tendent à se redresser le long des valves et si la moule est relativement grosse par rapport à l'astérie on verra même celle-ci se coucher sur le fond, le bivalve entièrement caché entre ses bras (ce qui ne l'empêchera pas d'être bientôt vidé). Si d'ailleurs les bras exerçaient des tractions divergentes, celles-ci se transmettraient à la coque par la tension élastique des podia qui risqueraient de se décoller (car ils sont beaucoup moins adhérents que ceux des oursins). LAVOIE (1956), par un procédé pneumatique trouve qu'une astérie moyenne agissant sur une moule dont le muscle a été remplacé par un ressort exercerait une traction allant jusqu'à 800 g. De mon côte, j'ai fixé sur des valves de moules vivantes avec de l'araldite des crochets d'acier pour y suspendre des poids marqués. Mesurant le baillement de la coquille avec des calibres, je constatai qu'un poids de 800 g ne provoquait qu'un écartement de 1/10 mm. Celà montre la résistance considérable des muscles de moule, mais d'autre part ce baillement de 1/10 mm suffit à l'astérie pour introduire la muqueuse de son cardia extroverti: La moule bientôt digérée dans sa propre coquille relâchera ses muscles adducteurs ramollis et s'ouvrira.

La moule n'est pas digérée parce qu'elle est ouverte mais s'ouvre parce qu'elle est digérée.

J'ai d'ailleurs fait digérer par des *asterias* en aquarium des moules serrées dans de puissants bracelets de caoutchouc ou dont les valves étaient maintenues serrées par 2 écrous et boulons transversaux en acier oxydable. C'est donc que les puissants sucs protéolytiques parviennent à s'infiltrer entre les bords de conchyoline ramollis des valves ou dans les interstices entre les boulons et la coquille.

Les sécrétions gastriques sont les grandes responsables de cette digestion externe mais on peut se demander dans quelle mesure les sécrétions des nombreux podia maintenant le mollusque peuvent intervenir. Ceux-ci possèdent latéralement de grosses glandes à mucus à sphérules clairs et CHAET et PHILPOT (1964) ont observé au microscope électronique des «secretion packets», émis par des cellules du sous-bassement conjonctif et expulsés par des canalicules entre les cellules épithéliales du disque.

La perpétuelle agitation des podia rend difficile l'expérimentation sur une astérie retournée. Cependant un fragment de muscle de crabe, après avoir excité l'activité des podia, provoque leur rétractation et le fragment est entraîné dans la gouttière ambulacraire. Simultanément les épines des plaques adambulacraires se referment comme les deux parties d'une fermeture-éclair (zipper) et le bras tend à se couder à cet endroit. Au bout de plusieurs heures de patience, on peut constater sous le microscope que le fragment de muscle est en grande partie liquéfié. CUENOT (traité de GRASSE) après JENNINGS (in HYMAN, 1955, p. 375) avaient remarqué, sur la face aborale la capture de petits annélides ou crustacés par les pédicellaires des rosettes. Selon CUENOT, les proies qui sont tuées seraient

abandonnées par l'astérie. En fait les petits pédicellaires laissent échapper les proies un peu grosses pour eux, mais si on maintient la proie en place, elle est attaquée, quoique lentement. Mais des proies submicroscopiques ou déjà partiellement décomposées sont sans doute utilisables: En effet, FERGUSON (1963-4-5-6-7) a montré sur ses autoradiographies la rapide pénétration des amino-acides dans l'épiderme des 2 faces des astéries, en particulier au niveau du disque des podia (que j'ai pu colorer intérieurement en violet par contact avec des proies imprégnées de ninhydrine).

La puissante *Marthasterias glacialis* est un bien meilleur matériel pour ces expériences. Capable d'absorber buccalement de grosses proies, on pourrait penser qu'une digestion cutanée serait pour elle un luxe inutile. Il n'en est rien. Sa face aborale est hérissée de grosses pelotes de pédicellaires séparant des couloirs tapissés de papules et de «gros» pédicellaires en bec de canard dentés. Il est facile d'y coïncer de petits annélides, des planaires, des amphipodes, des fragments de moule. Des planaires comme *Oligocladus* sp. fondent à vue d'oeil (15 min). De petits annélides disparaissent en 3–4 heures.

V. Cas des ophiures (Ophiothrix fragilis)

Beaucoup d'ophiures sont microphages; tel est le cas des *Ophiothrix* qui vivent en bancs nombreux, sur des fonds stériles redressées dans le plan vertical, les bras étendus dans le sens du courant. La surface de ces longs bras épineux bardés de podia à villosités glanduleuses contraste avec celle de la poche stomacale qui représente le plus rudimentaire des tubes digestifs (chez certaines ophiures elle disparaît même avant la ponte). Il y a donc lieu de penser que les bras puissent se nourrir de façon autonome par voie cutanée. STEPHENS (1965) a d'ailleurs montré l'absorption rapide de la glycine marquée à très faible concentration dans de l'eau de mer par *Ophiactis.* Au bout d'une demi-heure la teneur de l'ophiure en glycine atteint 60 fois la concentration extérieure et l'expérience réussit aussi bien avec les bras autotomisés seuls qu'avec l'animal entier.

D'autre part, PASTEELS (c.p.) m'a aimablement communiqué les clichés en couleur de coupes de bras d'*Ophiothrix* ayant séjourné dans une solution marine de ferritine. Les coupes traitées par la réaction de PERLS montrent la couleur du bleu de Prusse localisée sourtout à l'intérieur des podia, dans leur moitié distale. La réaction de PERLS étant spécifique du fer et non de la ferritine, on ne peut savoir si cette protéïne a été absorbée intacte par pinocytose ou si la protéïne a été digérée, les ions ferriques et les amino-acides étant absorbés ensuite.

Un petit annélide perforant du genre *Polydora* fut placé en travers d'un bras d'*Ophiothrix,* les extrémités coïncées entre les épines barbelées. Au bout de quelques heures, ces extrémités étaient digérées, le milieu du corps étant encore reconnaissable. Ces expériences sont rendues difficiles par la mobilité et la fragilité des animaux. Dans «NATURE» (PEQUIGNAT 1966a), j'indique l'action des bras d'*Ophiotrix* (dont le disque est enfermé dans une capsule de plastique à encoches) sur des surfaces nutritives tapissant des boîtes de Pétri. Il y a une évidente corrosion et les bras en contact avec de la gélatine à la ninhydrine se colorent en violet.

D. Les coelomocytes à sphérules. Leur rôle

Dès mes premières expériences sur les réactions des oursins aux substances organiques déposées à leur surface, je fus frappé par l'apparition rapide de points rouges groupés le long des cannelures des piquants. Chez un *Echinocardium* jaune pâle, l'excitation alimentaire peut donner en 1/2 heure une teinte rosée à toute la touffe apicale.

Les piquants observés au microscope dans une goutte d'eau de mer montrent à leur surface des alignements de coelomocytes émigrant à travers l'épithélium en dégageant l'un après l'autre leurs lobes arrondis chargés de granules sphéruleux. Beaucoup ne sont plus rattachés au piquant que par un mince pédicelle qui finit par se rompre. Chez *Echinocardium,* ces cellules émigrantes sont surtout des cellules colorées en jaune citron brillant et, en moindre quantité, des cellules rouges («éléocytes» de BOOLOOTIAN, 1958 et 1962). Chez les *Psammechinus,* le long des cannelures, il se détache beaucoup de ces «éléocytes» rouges ainsi que des cellules incolores (corps mûriformes de CUENOT, 1791). Les données de la littérature sur les coelomocytes me semblant très insuffisantes, j'ai dû entreprendre moi-même leur étude sur *Psammechinus* et *Echinocardium.* Les résultats en sont résumés dans une note (PEQUIGNAT, 1966 b). Ne considérons ici que les amoebocytes à sphérules qui semblent seuls jouer un rôle dans la digestion cutanée: Les corps mûriformes incolores (que j'appelle morocytes) existent dans les 2 espèces mais sont beaucoup plus nombreux chez *Psammechinus.* Leurs gros granules flous sont riches en proteïnes et se colorent fort bien au bleu de toluidine et au bleu de Nil. Chez les jeunes *Psammechinus* (2 cm) où les coelomocytes rouges sont encore peu nombreux, ces morocytes sont déjà très actifs dans les cannelures des piquants.

Les prétendus «éléocytes» – qui malgré ce nom ne renferment pas d'inclusions huileuses – ont un cytoplasme colorable à l'orangé G; les granules qui doivent leur couleur rouge-vif à des échinochromes sont très fuchsinophiles et prennent tous les colorants nucléaires (Feulgen, hématoxyline de GROAT) et sont parfois PAS +. Très fragiles à l'égard des fixateurs (sauf formol marin et Zencker Helly) ils ont un noyau circulaire. Je les appelle *rubocytes.* Les cellules jaune citron des *Echinocardium* ne sont décrites nulle part. Leurs granules sont très réfringents; le pigment jaune, indestructible ajoute sa propre couleur aux teintures histologiques si bien que des cellules donnent au PAS une couleur cuivrée et au bleu de toluidine ou à l'Alcian un vert émeraude. Je les nomme *xanthocytes.*

Enfin, ces granules jaune-brunâtres qui trainent dans le conjonctif et que certains auteurs ont pris à tort pour des débris des cellules précédentes sont le fait de cellules jaunâtres pleines de grains de taille irrégulière avec un ou deux noyaux picnotiques arrondis, bruns. Je les appelle *lysocytes.* Dans leur forme juvénile ils présentent de petits granules jaune pâle (*granocytes*).

Ces derniers ne semblent pas sortir par diapédèse (sauf peut être dans le tube digestif d'*Echinocardium*) mais se désagrègent sous l'épiderme et doivent collaborer à l'élaboration du mucus qui imprègne celui-ci. Ces cellules désagrégées sont PAS+, se colorent aussi au Bleu Alcian et donnent un résultat positif au test des arylamidases. (1. leucylnaphtylamide + Fast blue B).

Ces lysocytes interviennent sans doute, en seconde ligne, par leurs sécrétions, dans la digestion cutanée alors que rubocytes, morocytes, xanthocytes vont directement attaquer l'aliment externe au contact duquel ils se décomposent, colorant de leurs propres pigments les petits objets déposés sur les épidermes. La digestion cutanée est donc une digestion de contact où la pellicule muqueuse et les cellules amoeboïdes actives et fragiles interviennent simultanément.

On comprend qu'elle agisse principalement sur les très petites proies maintenues contre les cellules épidermiques de tout le corps. La diapédèse des coelomocytes déjà signalée par KINDRED (1921) au niveau des branchies d'*Arbacia* s'observe en n'importe quel endroit du test, des piquants, des pédicellaires et des sphéridies (où elle est souvent intense).

E. Recherches enzymologiques

I. Matériel et méthodes

Les remarques précédentes expliquent la difficulté de concentrer, d'isoler, d'identifier les enzymes d'origine variée dispersés dans une mince pellicule muqueuse adhérant à la peau.

J'ai fait des essais sur des broyats d'organes riches en coelomocytes (branchies de *Psammechinus,* clavules d'*Echinocardium*) après centrifugation. J'ai utilisé aussi le liquide muqueux obtenu par essorage à la centrifugeuse (2 500 r.p.m) de bras d'étoiles de mer vidés de leurs organes internes et d'oursins intérieurement nettoyés et remplis de cire molle. J'ai également tenté certaines réactions colorées sur le vivant.

II. Les amylases

Des extraits de branchies de *Psammechinus,* de clavules d'*Echinocardium* du liquide centrifugé de bras de *Marthasterias* et de tests d'oursins décomposent à volume égal, en moins de 2 heures de l'empois d'amidon Merck à 0,15 % à la température ambiante (22 °C) vers pH 6,8 (Indicateur; lugol dilué au 1/10).

Avec la collaboration de TIFFON (PEQUIGNAT et TIFFON, 1967) j'ai chromatographié sur papier les produits de cette digestion amylacée. Nous avons décelé une très notable quantité de maltose, mais pas de glucose.

III. Les arylamidases

Les mêmes extraits que ci-dessus donnent en quelques heures à 27 °C et pH 6,7 une réaction très positive par rapport aux témoins sur le mélange l-leucyl-naphtylamide + Fast blue B. Le sulfate de cuivre donne dans les tubes ayant rougi un précipité de chélation violacé. J'ai même essayé cette réaction in vivo sur des *Echinocardium* «dorsalement nourris» pendant quelques heures de gélatine imprégnée de substrat. Les animaux, trempés ensuite dans de l'eau de mer légèrement jaunie au Fast Blue B ne tardent pas à développer une teinte rougeâtre dans toute la région du fasciole interne. Le mucus est bien teinté et un examen par transparence au microscope des clavules et des petits piquants montre que le tissu conjonctif et les lysocytes sont colorés.

IV. Le problème des protéases

a) Essais sur caséine modifiée

La présence, dans les extraits, de pigments naphtoquinoniques très opaques aux U.V. rend très difficile l'emploi des méthodes spectrophotométriques classiques. J'ai donc utilisé le procédé de CHARNEY et TOMARELLI (1947) qui permet de faire dans le spectre visible (418 nm) une cinétique de l'hydrolyse de la diazocaséine. Ce substrat, orangé, soluble au-dessus de pH 7,8 a une densité optique égale à celle de ses produits d'hydrolyse à cette longueur d'onde: Si D_0 est la densité optique de la solution initiale; si D est celle du surnageant de défécation après un temps t d'incubation, la différence $D_0 - D$ est proportionnelle à la concentration du substrat non encore hydrolysé à ce moment. Si l'hydrolyse enzymatique a une allure de réaction monomoléculaire, on doit avoir:

$$D_0 - D = D_0 e^{-kt} ,$$

ou en log. népériens:

$$L(D_0 - D) = - kt + LD_0 .$$

La courbe semi logarithmique sera donc une droite décroissante de pente $-k$ à partir de l'ordonnée initiale LD_0.

Les fig. 7 et 8 donnent les résultats obtenus avec des extraits épidermiques préparés par congélation, grattage, broyage à froid et centrifugation en présence de tampon phosphaté à pH 7,8 (temp.: 32 °C).

La fig. 7 est relative à des *Psammechinus,* la fig. 8 à *Asterias rubens.* Les résultats sont positifs mais faibles. Si les points s'alignent bien sur une droite décroissante, la demi digestion du substrat (intersection de cette droite avec l'horizontale $y = \frac{D_0}{2}$) n'est réalisée qu'en

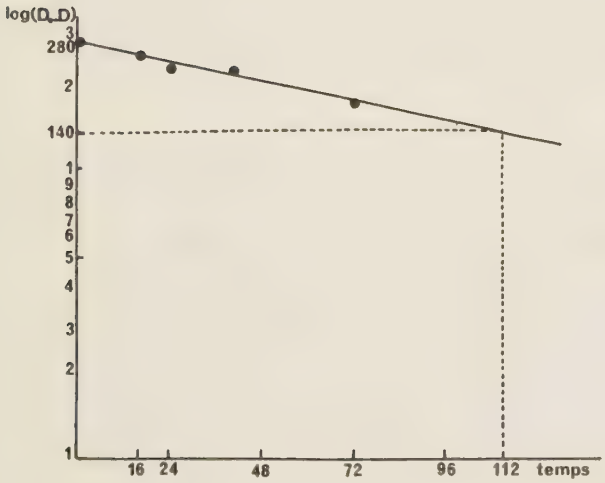


Figure 7

Digestion in vitro de diazo-caséine par un broyage épidermique centrifugé de *Psammechinus*

Do: densité optique initiale de la diazo-caséine (à 418 nm)
D: densité optique du surnageant de défécation de la protéine au temps t
En ordonnées: log (Do-D).
En abscisses: le temps, en heures

Figure 7

Digestion of Diazo casein (CHARNEY et TOMARELLI) by an epidermic extract of *Psammechinus*

Do: optical density of the substrate (418 nm)
D: optical density of the supernatant after defecation of the protein at hours
Ordinates: log (Do–D)
Abscissi: time (in hrs)

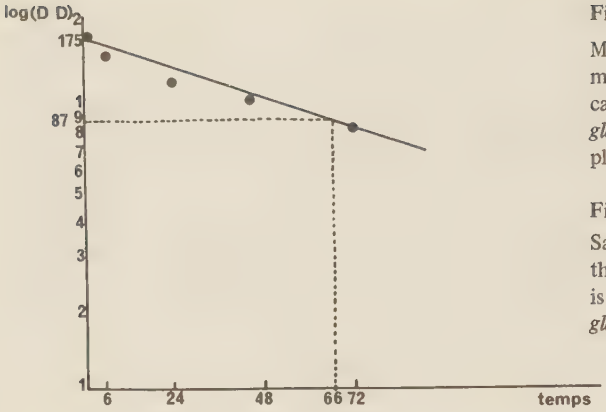


Figure 8

Mêmes légendes que dans la figure 7 mais l'échantillon agissant sur la diazo-caséine est un extrait de podia d'*Asterias glacialis* congelée. L'action est un peu plus rapide

Figure 8

Same representation as in figure 7, but the sample digesting diazo-casein here is a podial extract of congelated *Asterias glacialis*

112 heures avec l'oursin et 66 avec l'étoile de mer. (On obtiendrait les «k» correspondants en heures $^{-1}$ en divisant L 2, c'est-à-dire 0,692 par ces chiffres.) La méthode ne permet malheureusement pas d'opérer à des pH plus bas que 7,8 alors que les sécrétions épidermiques centrifugées ont un pH de 6 à 6,5 . D'autre part notre procédé assez brutal d'extraction donne sans doute des liquides assez pauvres en enzymes et trop riches en impuretés protéiques qui entrent en compétition avec le substrat pendant l'incubation.

b) Essais avec la Benzoyl-Arginine-naphtylamide + Fast Blue B

Nous avons testé nos divers extraits d'oursins ou d'astéries à 32 °C et à des pH allant de 6,5 à 8 sur ce substrat spécifique de la trypsine: Tous les essais «in vitro» furent totalement négatifs. Cependant, si l'on fait digérer dans le sillon dorsal d'un *Echinocardium* de la gélatine imprégnée de B.A.N., puis qu'on immerge l'animal quelques heures après dans une solution marine étendue de Fast Blue B, on obtient un rougissement rapide et intense du mucus de la coiffe apicale: Celà montre à quel point peuvent différer les conditions de l'action enzymatique selon qu'elle s'effectue «in situ», au contact des cellules vivantes ou «in vitro», après des traitements un peu aveugles.

c) Action sur les films photographiques

Nous avons utilisé des plaques orthochromatiques toutes noires, développées, ou des diapositives non exposées et développées Kodachrome et Ferrania (FRATELLO, 1968).

J'ai signalé les curieux «digestogrammes» obtenus par contact de disques podiaux de *Psammechinus* sur les plaques noires. Sur les fims en couleur, plus sensibles, on peut rapidement obtenir des taches auréolées, à 30 °C avec des morceaux de papier-filtre laissés un quart d'heure en contact du test d'un *Echinocardium* ou d'un *Psammechinus.* On opère en chambre humide, les pellicules ayant été imprégnées de tampon à pH 6,9 puis sommairement séchées à l'air. On prend comme témoins des morceaux de papier filtre indentiques mais imprégnés d'eau de mer naturelle. Une goutte de mucus fasciolaire d'*Echinocardium* avec un bouquet de clavules dissout très vite la gélatine colorée.

d) Conclusions sur les protéases

La simple constatation des digestions cutanées et les résultats donnés ci-dessus établissent l'existence d'endopeptidases dans la pellicule muqueuse épidermique des échinides et stellérides mais il reste à mettre au point des techniques plus fines pour extraire correctement et purifier (soit par électrophorèse soit par ultrafiltration) les divers types d'enzymes afin de les déterminer au moyen de substrats artificiels spécifiques.

V. Chitinases et cellulases

En collaboration avec mon collègue J. BOCQUET, j'ai recherché les enzymes chitinolytiques d'après les techniques de JEUNIAUX (1962), OKAFOR (1955), ALLIOT et BOCQUET (1968). Nous avons préparé des suspensions de chitine native d'os de seiche à 5 mg/ml sur lesquels nous avons fait agir à des pH de 4,8 à 6,9 à 31 °C des broyats épidermiques filtrés ou des liquides d'essorage d'*Echinocardium*, *Psammechinus* et *Marthasterias*. Malgré de longues incubations, on n'a pu déceler dans les tubes la moindre trace d'acétylglucosamine.

Si donc, sur le vivant, certaines cuticules de tout petits crustacés semblent se dissocier, il s'agit sans doute d'une attaque des protéines associées et d'une décalcification. Nous nous proposons de rechercher les anhydrases carboniques.

Je n'ai pas recherché les cellulases mais le fait que des fibres de coton hydrophile ne semblent pas altérées au contact du test indiquerait une absence probable de ces enzymes.

VI. Cas des lipides

Des gouttelettes d'huile ou des parcelles de beurre noircies au Soudan Black en poudre ne sont que lentement éliminées dans le mucus le long des cannelures des piquants dont les extrémités se colorent en noir. Au microscope, on voit à la surface des radioles un film bleuâtre où des gouttelettes grasses sont plus ou moins émulsionnées. La matrice squelettique et les lysocytes prennent une teinte grisâtre ou même gris-rougeâtre (métachromasie du Soudant). Il est vraisemblable que des lipides bien émulsionnés puissent être utilisés à travers l'épiderme. Seul, l'emploi de glycérides radioactifs suivis d'autoradiogrammes sur coupes à congelation pourrait permettre de l'affirmer.

F. Expériences avec des aliments radioactifs

I. Principe et ordre des expériences. Techniques utilisées

Pour démontrer sans conteste non seulement la digestion superficielle mais encore l'absorption et la fixation des produits en résultant, il n'est pas de meilleure méthode que l'usage de traceurs radioactifs: ^{14}C et tritium. Nous disposions d'un compteur IDL (Elliott-Automation) avec une tête de scintillation liquide à température ordinaire et une tête «windowless» à scintillation solide. La scintillation solide est inutilisable pour le tritium. Avec le ^{14}C elle donne un rendement 20 fois moindre et un bruit de fond plus intense, mais étant pratique, rapide et économique je l'ai utilisé dans certains cas, lorsque je disposais au départ de fortes activités spécifiques. J'ai utilisé parallèlement l'autoradiographie de coupes décalcifiées plongées à 42 °C dans l'émulsion en gelée K_2 et L_4 d'Ilford.

Ayant d'abord étudié l'absorption d'amino-acides ou de glucose en solution marine, j'ai mesuré en fonction du temps la disparition des produits dans le milieu. Après lavage et dissection, les différents organes, des parties aliquotes du test étaient comptées pour déterminer les quantités retenues par les tissus et établir le bilan total des échanges. Dans plusieurs expérience le $^{14}CO_2$ rejeté était piégé dans un flacon laveur à soude normale et compté.

Ensuite, j'ai surveillé au binoculaire la digestion d'aliments marqués complexes sur la face aborals des oursins et étoiles de mer: D'abord il s'agissait de poudres riches en protéines marquées extraites de branchies de moules nourries à la proline tritiée à forte activité spécifique (5 Ci/M). Puis j'ai utilisé des branchies fraîches de moules radioactives ayant concentré un mélange d'animo-acides à fort marquage d'Amersham R.C. Après avoir constaté la dissolution complète de ces aliments dermiques, les animaux étaient maintenus quelque temps en eau de mer avant lavage, dissection et «comptage» des diverses parties du corps.

Enfin, pour visualiser le transit des produits radioactifs, de petits animaux, après avoir été soumis à ces digestions aborales et lavés étaient fixés au formol marin, décalcifiés (T.C.A. et E.D.T.A.), inclus à la celloidine-paraffine et coupés «in toto» aux fins d'autoradiographie par trempage dans les émulsions Ilford (Temps de pose: 6 semaines à 4 °C). Certains comptages ont posé des problèmes techniques. Ainsi, le sel marin est mal toléré par les solutions scintillantes. On a parfois utilisé le dessalement sur résine pour des expériences de très haute précision (PEQUIGNAT et PUJOL, 1968), mais plus simplement je faisais évaporer l'eau de mer – ou le «sang» d'oursin sur un rectangle de papier kleenex étalé sur la paroi du flacon de comptage – et mesurais le quenching (10 à 25 %). Dans le cas de la scintillation solide, il fallait tenir compte, suivant la méthode classique, de l'auto-absorption dans les coupelles du fait des dépôts de sels – ou de soude (dans les mesures concernant le piège à CO_2).

Pour les fragments d'organes, j'ai toujours évalué séparément la radioactivité des alcools à 80 % où macéraient les échantillons et qui dissolvaient les petites molécules non incorporées (n. inc sur les tableaux) et celle des culots de centrifugation contenant les macromolécules (inc). Ces culots étaient digérés par l'acide nitrique CC à 70 °C selon la méthode d'ELDEFRAWZI (1966), qui respecte parfaitement les protéines et polysaccharides. Nous avons toujours mesuré le quenching en ajoutant dans les flacons de petites quantités, pesées avec précision de solution radioactives toluéniques titrées avant chaque mesure. Les comptages ont été répétés à quelques jours d'intervalle et les échantillons pris en double si possible. Ils s'effectuaient à nombre de coups constant (en général 10 000). Le calcaire des tests et les pigments nous ont posé quelques problèmes: Les fragments ont été traités tout d'abord par du liquide de Carnoy (alcool-chloroforme – ac. acétique). Non seulement ce mélange dissout parfaitement tous les pigments (échinochromes, caroténoïdes, lipofuchsines) et les lipides mais commence la décalcification et rend le matériel très friable. Après centrifugation, le premier culot est traité par un mélange à parties égales d'alcool à 90 % et d'HCl pour réaliser une décalcification complète et laver ce qui peut rester de petites molécules solubles dans l'alcool dilué. Après une nouvelle centrifugation, le culot, bien séché, pourra être traité par la méthode d'ELDEFRAWZI. La solution en Carnoy étant souvent teintée de pigments, il ne faut pas en prendre une trop grande quantité car si le kleenex du flacon est trop coloré, le quenching devient excessif. La deuxième solution, riche en $CaCl_2$ donne aussi du quenching – que l'on mesure – mais, en général, sa radioactivité est faible, la plupart des petites molécules ayant été épuisée par le Carnoy. On ajoute les résultats des deux mesures pour évaluer la radioactivité «non incorporée».

II. Absorption de molécules dissoutes

a) Expériences sur la proline tritiée (PEQUIGNAT et PUJOL, 1968)

Elle sont décrites en détail dans une publication conjointe. Disposant de proline très marquée (5 Ci/M) et utilisant des techniques «fines» (dessalage sur résines, évaproations etc) nous avons pu, dans un essai, descendre à des concentrations extraordinairement basses: $4 \cdot 10^{-7}$ millimoles/l-soit 50 fois inférieures aux plus faibles utilisées par

STEPHENS (1968) sur *Ophiactis*. L' équilibre est atteint en quelques heures quand les 3/5 de la proline extérieure sont absorbés. Après 3 jours au contact de la solution et 2 jours dans l'eau de mer fraîche, les animaux sont disséqués pour comptage. Environ 75 % de la radioactivité disparue de l'eau se retrouve dans le corps des 2 *Psammechinus* en expérience. 92 % de l'activité retenue intéresse le test (dont 75 % sous forme «incorporée»). La tube digestif vient ensuite avec quelques unités % puis les gonades (immatures) et le liquide coelomique. L'activité spécifique de l'oursin total égale 20 fois celle du liquide ambiant.

Des autoradiographies effectuées sur des *Psammechinus* d'un cm placés à l'envers dans une boîte de Pétri renfermant de l'eau de mer à la proline tritiée pendant une demi-heure (la bouche hors du liquide) nous ont permis de faire des autoradiographies de contrôle. On constate un fort marquage du test. Le marquage est très atténué si les coupes ont été soumises au préalable à l'action d'une collagénase purifiée.

b) Absorption de ^{14}C tryptophane et de ^{14}C glucose

Disposant de ^{14}C tryptophane à 52 Ci/mM, je voulus me rendre compte si, comme pour les ophiures de STEPHENS et VIRKAR (1965) la quantité d'amino-acides absorbée était bien proportionnelle à la dose offerte, autrement dit: La concentration active du produit par l'animal est-elle indépendante de la teneur en amino-acide du milieu? J'ai opéré en scintillation solide. Dans l'expérience (1) 150 ml d'eau de mer filtrée stérile est additionnée de 90 000 U de streptomycine et de 2 μ Ci de tryptophane actif ($2{,}5 \cdot 10^{-4}$

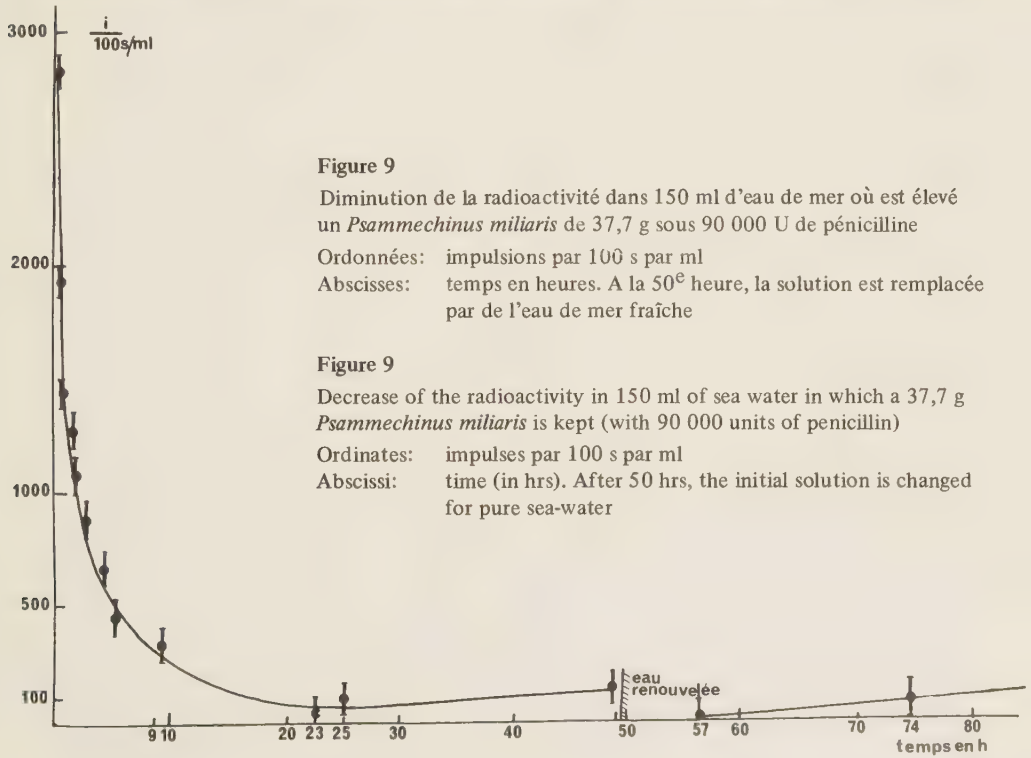


Figure 9

Diminution de la radioactivité dans 150 ml d'eau de mer où est élevé un *Psammechinus miliaris* de 37,7 g sous 90 000 U de pénicilline

Ordonnées: impulsions par 100 s par ml
Abscisses: temps en heures. A la 50^{e} heure, la solution est remplacée par de l'eau de mer fraîche

Figure 9

Decrease of the radioactivity in 150 ml of sea water in which a 37,7 g *Psammechinus miliaris* is kept (with 90 000 units of penicillin)

Ordinates: impulses par 100 s par ml
Abscissi: time (in hrs). After 50 hrs, the initial solution is changed for pure sea-water

mole/l). On y entretient sous bonne aération un gros *Psammechinus* de 37,7 g. Des prélèvements de 0,5 ml de solution sont faits (à intervalles rapprochés, au début) pour établir la cinétique de l'absorption (courbe fig. 9). La courbe a exactement la même allure que dans mes expériences avec PUJOL: Diminution presque «verticale» dans les premiers quarts d'heure, puis décroissance exponentielle rapide (2 heures) et enfin courbe d'équilibre jusqu'à un palier constant pendant plusieurs jours (120 i/100 s/ml au lieu de 2 600 au début). A la 50 ème heure, l'oursin est lavé et la solution nutritive remplacée par de l'eau de mer pure. Aut bout de 88 heures on trouvait dans cette eau une très faible radioactivité (10–12 i/100 s/ml) indiquant que l'animal commençait à «excréter de la radioactivité». L'animal est sacrifié, disséqué et les comptages donnent les résultats consignés sur la table II.

La radioactivité totale de l'oursin (87 137 i/100 s) ne représente que 25 % de la radioactivité disparue de la solution marine: C'est que, pendant 5 jours, l'animal a respiré et excrété, oxydant une bonne partie du tryptophane absorbé (comme l'expérience suivante va

Table II. *Psammechinus* nourri pendant 48 h de tryptophane dissous ($2{,}5 \cdot 10^{-4}$ M/l) et sacrifié au bout de 88 heures

Table II. *Psammechinus* fed for 48 hrs with dissolved tryptophan ($2{,}5 \cdot 10^{-4}$ M/l) killed and dissected after 88 hrs

Organes	Poids (g)	% total N	Activité totale i/100 s ± 10 %	Activité spécif. (mg)	Activité per mg N	% total absorbé	
Liquide coelom.	13,07	0,01	4 836	0,37	–	5,4	
Pharynx Lanterne	0,10	1,52	1 230	12,3	0,082	1,5	
Estomac	0,21	1,7	n. inc 3 327 inc 460	18	0,110	4	8,3
Intestin	0,33	1,7	n. inc 1 099 inc 370	4,5	0,026	1,7	
Rectum et apex	0,08	1,5	865	10,8	0,072	1,1	
Gonades	2,5	1,2	n. inc 14 402 inc 4 500	8	0,066	23	
Test Radii	8,33	0,45	n. inc 15 048 inc 7 270	2,7	0,06	28	63,3
Test Inter-rad.	13,03	0,41	n. inc 14 130 inc 16 600	2,4	0,06	35,3	
Total	37,68		86 137			100	

le confirmer). Là encore, le tableau montre la prédominance du test (63 %). Dans la répartition de l'aliment. Les glandes génitales sont bien «servies» chez ce gros animal aux gonades mûres.

L'expérience (2) porte sur un *Psammechinus* plus petit (15,25 g) élevé dans la même solution que ci-dessus sauf qu'on a ajouté aux $2,5 \cdot 10^{-4}$ M/l de tryptophane marqué une dose 9 fois plus forte de tryptophane froid. D'autre part l'air traversant le flacon d'élevage passe ensuite dans un laveur contenant 150 ml de NaOH normale pour piéger le CO_2.

La courbe d'absorption a une allure identique. Au bout d'une dizaine d'heures on parvient à un équilibre stable quand il reste 1/5 du tryptophane en solution. La radioactivité disparue correspond à un total de 93 000 i/100 s mais le piège à CO_2 donne en fin d'expérience une activité totale de 42 000 coups (respiration). L'oursin a donc pu fixer au maximum 93 000 – 42 000 = 51 000 i/100 s. Or les comptages d'organes (table III) donnent un total de 40 000 coups, en gros. Il y a donc un déficit de 20 % explicable par le lavage du test avant dissection et diverses pertes en cours d'expérience ou de traitement des tissus – sans parler des erreurs statistiques. Dans la table III, j'appelle activité spécifique relative le rapport de l'activité spécifique de l'organe à celle de l'animal entier (liquide coelomique inclus).

Table III. *Psammechinus* nourri 48 h de tryptophane ($2,5 \cdot 10^{-3}$ M/l) tué le 5è jour

Table III. *Psammechinus* fed for 48 hrs with tryptophan ($2,5 \cdot 10^{-3}$ M/l) killed after 5 days

Organes	Poids (g)	Activité i/100 s	Activité spéc. relative	% Total absorbé
Tube digest.	0,40	n. inc 755 inc 660	3,5	3,7
Gonade	0,91	n. inc 5 120 inc 1 620	7,1	17,6
Test	8,00	n. inc 19 280 inc 11 580	3,67	76,3
Liquide coelom.	5,94	960	0,16	2,4
Total	15,25	39 975	1	100

Les résultats sont très comparables à ceux du Table II : même hiérarchie en pourcentage : Test – Gonades – Tube digestif – Sang. Le rendement total est du même ordre ainsi que la radioactivité finale des organes par gramme. Mais rappelons qu'ici la même radioactivité que précédemment signifie 10 fois plus de tryptophane. Il y a donc à peu près proportionnalité entre les concentrations externes et internes de tryptophane en fin d'expérience. Au bout de cinq jours, nous trouvons dans les 2 cas un coefficient de concentration par rapport au milieu ambiant résiduel de 20 à 24. J'ai voulu voir ensuite si ce coefficient ne serait pas plus élevé pour des animaux de petite dimension : Disposant d'une minuscule *Asterias rubens* incolore (4 mm, 1,75 mg) je la plaçai dans 8 ml de solution marine filtrée

de ^{14}C tryptophane pendant 48 h. Les antibiotiques nécessaires étaient ajoutés, l'activité de la solution étant initialement de 7 800 i/400 s (environ $2{,}5 \cdot 10^{-4}$M/l). Après 24 h de lavage en eau de mer courante, l'astérie fut broyée dans quelques gouttes d'ac. formique et d'ac. nitrique. Le résidu d'évaporation repris par le méthanol fut compté sur coupelle et donna 6 700 i/400 s.

La solution nourricière ne donnait plus, en fin d'expérience que 6 100 i/400 au lieu de 7 800; soit pour les 8 ml une perte de $(7\,800 - 6\,100) \cdot 8 = 13\,600$ coups.

L'astérie avait donc retenu la moitié de cette radioactivité vite disparue. Son activité spécifique en i/400 s/mg était de 6 700/1,75 mg = 3.834 alors que la solution nutritive avait une a. s. de 6 100/1 000 mg = 6,1. L'amino-acide s'était donc concentré dans la petite astérie dans le rapport 3 834/6,1 = 628. Ce chiffre 30 fois plus élevé que chez un oursin adulte est dans l'ordre de grandeur de ceux obtenus par BERG (1968) sur des plutei de *Latechinus* en Californie et de ceux de BASS et CHAPMAN (1969) sur des trochosphères de néréidiens.

Enfin j'ai expérimenté sur *Psammechinus* des solutions marines antibiotiques de ^{14}C glucose à 42 pCi/mM.

Utilisant 2 μ Ci dans 150 ml d'eau, j'obtenais une concentration de $3 \cdot 10^{-4}$mM/l. Vu la rapide métabolisation du glucose je ne fis durer l'expérience que 24 h et utilisai un piège à CO_2. Le glucose dissous s'élimine ainsi:

tps	0	1/2 h	1 h	3 h	5 h	22 h
i/ml 400 s	1 790	1 430	1 463	1 064	1 135	885

En 24 h, la moitié du glucose a donc disparu 1 790 − 885 = 895 i/400 s/ml. Le CO_2 capté dans le piège (qui comporte 150 ml de soude) correspond à 525 i/400 s/ml. L'oursin, comme on pouvait le prévoir a «respiré» plus de glucose qu'il n'en a fixé. Il a dû conserver: 895 − 525 = 370 i/400 s/ml soit au total $370 \cdot 150 = 55\,500$ coups. En fait, nous n'en trouvons que 30 000 environs répartis comme suit (table IV).

Table IV. *Psammechinus* nourri 24 h de ^{14}C glucose ($3 \cdot 10^{-4}$ M/l)

Table IV. *Psammechinus* fed for 24 hrs with ^{14}C dextrose ($3 \cdot 10^{-4}$ M/l)

Organes	Poids (g)	Activité i/400 s ± 15 %	% Total absorbé	Radioactivité spécifique i/400 s/g
Test	2,9	n. inc 12 000 inc 15 060	91	9 000
Intestin	0,15	1 500	5	10 000
Gonades	1,15	700	2	600
Liq. coel.	0,6	680	2	1 100
Total	4,80	29 946	100	6 600

c) Expériences sur Echinocardium cordatum (Scintillation liquide)

J'ai expérimenté sur ce spatangoïde un mélange varié d'amino-acides marqués (mélange CFB 104 d'Amersham). La concentration employée n'était que $2 \cdot 10^{-7}$ M/l. (8 μ Ci dans 150 ml). Un piège à CO_2 était utilisé. Un compte-rendu assez détaillé de cette expérience est publié dans le bulletin de la Soc. de Biologie (PEQUIGNAT, 1969 a). La courbe obtenue a toujours la même allure et en quelques heures descend en un plateau correspondant à l'absorption des 19/20 du produit. Résumons les résultats (Après 2 jours d'expérience et 1 jour en eau courante). Le liquide nutritif a perdu au total 14 500 i/s; le piège en a retenu 3 290. L'animal aurait donc dû retenir 11 210 coups; on n'en retrouve que 6 230, ce qui peut s'expliquer par l'élimination du mucus lors du lavage avant la dissection. 97,25 % de cette radioactivité se retrouve dans le test, dont près de 60 % sous forme alcoolo-insoluble. Le tube digestif ne donne que 1,3 %, les gonades (très peu développées) 1,3 % et le liquide coelomique 1,1 %.
Le coefficient de concentration est d'environ 100 fois.

III. Utilisation d'extraits protéiques marqués

PUJOL (c.pers) a noté que des moules vivant dans une solution marine de proline tritiée accumulent considérablement ce corps dans leurs branchies, sous forme alcoolo-insoluble. A partir de telles branchies, broyées, congelées et décongelées, dégraissées à l'éther de pétrole, épuisées à l'alcool à 75 %, desséchées dans le vide en présence de P_2O_5, j'ai préparé une poudre conservée au congélateur ayant une très forte activité spécifique (21 000 i/400 s/mg). Dans ce produit, doit se trouver une grande proportion de protéines déféquées par l'alcool et qui doivent leur marquage à la proline tritiée. Vu son état très divisé, il est rapidement dissous dans le sillon aboral d'un *Echinocardium* ou sur la face apicale d'un *Psammechinus.*

J'ai nourri des *Echinocardium* de petite taille (10 mois) pendant quelques heures, par pincées successives déposées entre les piquants apicaux. Les animaux sont laissés 2 jours dans leur eau initiale (avec aérateur) avant d'être lavés et mis 3 jours en eau courante, les animaux sont disséqués comme de coutume pour le comptage des organes en scintillation liquide dont la table V donne les résultats.

Table V. Deux *Echinocardium* nourris de protéines tritiées de branchies de moules

Table V. Two small *Echinocardium* fed with tritiated proteins from mussel-gills

	Poids total (g)	Rendement	Sang	Gonades	Tube digest.	Test
Exper. A	7,2	10 %	7 %	non dév.	20 %	73 %
Exper. B	8,4	17,8 %	8,8 %	10,6 %	46,3 %	34,3 %

Le rendement global (2e col) peut paraître faible mais la dissection n'est intervenue qu'au bout de 6 jours: Il y a pu y avoir des pertes importantes par respiration et excrétion chez ces jeunes individus au métabolisme actif. D'autre part, le mucus avait été lavé avant dissection. Enfin, les produits solubles de la digestion diffusent facilement dans l'eau ambiante. En B, le tube digestif a été très marqué. Du fait de la digestibilité et de l'état divisé de la poudre, les produits digérés ou les particules à demi-digérées ont pu emprunter très vite le cordon muqueux descendant vers la bouche et être ensuite absorbés par l'intestin qui a un turn-over rapide et peut accumuler des réserves.

Avec de petits *Psammechinus,* on obtient des rendements moins bons, les particules de poudre nutritive n'étant pas si facilement retenues que dans le sillon des *Echinocardium* (d'où une certaine dispersion dans l'eau). Je trouve des chiffres de 4,5 à 6% de récupération; 65% de la radioactivité retenue est localisée dans le test (dont 90% sous forme incorporée). Celà m'a incité à utiliser des proies plus naturelles, plus adhérentes et d'un contrôle plus facile, à savoir des branchies vivantes radioactives marquées au ^{14}C.

IV. Utilisation de branchies fraîches de moules marquées

a) Sur *Echinocardium*

Un oursin de 20,5 g a reçu et liquéfié dans son sillon aboral 440 mg de branchie de moule nourrie de ^{14}C amino-acides (mélange d'Amersham) et correspondant à une activité totale de 1 175 000 i/100 s au compteur à scintillation liquide. Après 3 jours en eau courante et lavage, on retrouve au total dans les tissus 492 763 i/100 s (soit 42% de rendement). Le tableau VI en donne la répartition organique.

Table VI. *Echinocardium* apicalement nourri de 440 mg de branchie de moule marquée au ^{14}C

Table VI. *Echinocardium* dorsally fed with 440 mg of mussel-gills labelled with ^{14}C aminoacids

Organes	Masse (g)	Activité i/100 s	% Total absorbé	Activité spéc. relative
Sang	13	17 390	3,5	0,06
Test aboral	2,43	n. inc 121 250 inc 39 200	32	2,80
Test oral	3,69	n. inc 187 818 inc 55 565	49 (81)	2,70
Tube digest.	0,82	n. inc 42 801 inc 24 700	13,4	3,41
Gonades	0,54	n. inc 3 088 inc 642	0,6	0,30
Total	20,47	492 763	100	1

Là encore, c'est le test qui est, de loin, le plus grand bénéficiaire mais le tube digestif, du fait de sa faible masse et de son turn-over rapide a une activité spécifique plus élevée. (Il est vrai que la masse du test comporte une forte proportion de calcaire inerte.)

b) Expériences sur *Psammechinus*

Deux échantillons ont été nourris de moule radioactive marquée aux ^{14}C-amino-acides d'Amersham. L'un (14,1 g) a reçu 270 mg de branchie par voie cutanée, entre ses piquants aboraux, et on le suit pendant 24 h au binoculaire évitant que des fragments relâchés ne puissent atteindre la bouche. Il sera mis ensuite pendant 24 h en eau courante. L'autre (23 g) placé dans un cirstallisoir, le péristome vers le haut reçoit «à la becquée» entre ses mâchoires 1,7 g de branchie radioactive (au moyen de pinces fines). Le repas a demandé 2 h et l'animal est ensuite gardé 36 h en eau courante avant dissection. Les résultats de la première expérience (table VII et de sa contre-expérience table VIII) sont intéressants à comparer.

Comme on pouvait l'espérer, les résultats sont complètement inversés pour le test et le tube digestif: Avec la digestion «cutanée» on a 55,1 % de la radioactivité retenue par le test contre 33,4% dans le tube digestif. Dans le cas de la nutrition «classique» le test ne reçoit plus que 23,4% de l'activité contre 62,7 pour le tractus digestif (celle-ci déjà en grande partie incorporée). Ces derniers résultats sont très semblables à ceux obtenus par FARMANFARMAIAN (1962) en nourissant par la bouche un oursin californien d'algues radioactives. Dans nos expériences, la digestion cutanée a donné un rendement double de la digestion interne. Faut-il en conclure que les aliments directement ingérés sont incomp-

Table VII. *Psammechinus* nourri de 270 mg de branchie radioactive par voie cutanée

Table VII. *Psammechinus* fed with 270 mg of active mussel-gill through «skin digestion»

Organes	Masse (g)	Activité i/100 s ± 10 %	% Total absorbé		Activité spéc. relative	Rendement
Sang	2,40	9 285	2,4		0,14	
Test aboral	5,20	n. inc 48 077 inc 50 064	25,2	55,1	0,76	$\frac{390\,900 \cdot 100}{520\,000}$
Test oral	4,94	n. inc 22 611 inc 94 325	29,9		0,85	
Tube digest.	0,42	n. inc 64 852 inc 66 260	33,4		11,3	soit
Gonades	1,15	n.inc 22 557 inc 12 856	9,1		1,1	75,1 %
Total	14,11	390 877	100		1	

Table VIII. *Psammechinus* ayant reçu entre ses mâchoires de la branchie de moule marquée au ^{14}C

Table VIII. *Psammechinus* given radioactive ^{14}C mussel-gill through Aristotle's lantern

Organs	Masse (g)	Activité (± 10 %) i/100 s	% Total absorbé		Activité spéc. relative	Rendement
Sang	8,10	9 800	2,1		0,05	
Pharynx	0,10	17 200			8,4	
Estomac (boucle inf.)	0,36	n. inc 48 708 inc 121 410	62,7		23	$\frac{100 \cdot 443\,000}{1\,295\,350}$
Intestine (boucle sup.)	0,35	n. inc 34 483 inc 59 300			14	
Test aboral	5,17	n. inc 57 792 inc 17 550	16,8	23,4	0,75	soit
Test oral	8,17	n. inc 12 680 inc 16 894	−6,6		0,18	
Gonades	0,77	52 727	11,8		3,5	34,4 %
Total	23,02	443 044	100		1	

lètement digérés et partiellement rejetés par l'anus? Dans ce cas, une partie de ces «déchets» encore utilisables peuvent être réemployés au niveau des piquants apicaux. Ne voyons-nous pas sur le tableau VIII que la face aborale du test a une radioactivité spécifique 4 fois plus grande que la face orale. Inversement la nutrition cutanée ne va jamais sans un certain marquage du tube digestif. Les matériaux absorbés par le test peuvent sans doute gagner les réserves de l'estomac par le coelome et les lacunes hémales; mais encore n'oublions pas que le tube digestif s'abouche à ses 2 extrémités à l'épiderme cilié couvert de mucus en mouvement et, outre l'aspiration pharyngienne bien connue, j'ai constaté souvent des rétractations aspirantes du périprocte. Comme on ne peut obturer complètement le tube digestif sans altérer ces fragiles animaux, il est difficile de séparer totalement des processus de nutrition qui d'ailleurs ne s'opposent pas mais peuvent se continuer et se compléter l'un l'autre.

c) Expériences sur *Marthasterias glacialis*

Une demi-moule radioactive (^{14}C) hachée et distribuée entre les rosettes d'un bras (17 cm) d'une grosse *Marthasterias glacialis* incomplètement immergée en eau renouvelée est si complètement «digérée» qu'au bout de 9 heures, on ne peut plus reconnaître quel était les bras traité si on ne l'a pas marqué au bleu de méthylène. Dans mon expérience, l'autre moitié de la moule nourricière servait à déterminer la radioactivité de l'aliment, soit 117 560 i/100 s .

L'animal étant très gros et le comptage ne pouvant se faire que sur de très faibles parties aliquotes, les échantillons d'organes ne présentaient qu'une radioactivité peu intense. Il fallut donc opérer avec un soin particulier : Verrerie parfaitement décontaminée, longs comptages répétés, sur un grand nombre de coups – avec mesure exacte du bruit de fond entre chaque essai. J'ai pu ainsi obtenir une précision de ± 15–18 %. J'ai considéré comme non marqués (o) tout échantillon dont l'activité mesurée n'excédait pas de 20 % au moins le bruit de fond (entre 380 et 520 i/100 s).

Les gonades n'étant pas développées j'ai compté : Le tégument aboral, la sole orale avec ses podia, le coecum hépatique et le sang tant sur le bras «alimenté» que sur un bras voisin. J'ai recueilli également un morceau de poche stomacale (Table IX).

Table IX. *Marthasterias glacialis* dont un bras est dorsalement nourri d'une demi-moule radioactive (^{14}C)

Table IX. *Marthasterias glacialis* whose one arm is dorsally fed with half a ^{14}C radioactive mussel

Organes	Masse de l'échantillon	Activité de l'échantillon i/1 000 s ± 15 %	Activité spéc. i/1 000 s/mg	Activité organe entier	% Total activité
Bras traité	solut. 0,250	2 913	6,6	86 000	41,5
Tégument aboral	culot. 0,800	3 966		38 700	
Sole ambulacr.	solut. 0,250	0	ϵ	1 500 ?	
	culot. 0,456	ϵ			
Coecum dig.	0,428	2 810	6,5	11 800	6,3
Sang	0,604	229 ± 30 %	0,38	3 500	1,2
Total				148 500	49
Bras voisin	solut. 0,140	0	0	0	
Tégum.aboral	culot. 0,439	1 031	2,3	19 000	10,5
Sole ambul.	solut. 0,134	0			
	culot. 0,402	ϵ		500 ?	
Coecum dig.	0,300	698	2,3	6 650	2
Sang	0,538	ϵ	ϵ	1 500 ?	ϵ
				27 150	
Estomac	0,510			1 500	ϵ

Dans cette expérience, j'admets que les 4 bras non traités se sont comportés de même façon et je multiplie par 4 la radioactivité du «bras voisin» pour obtenir l'activité «émigrée» du bras nourricier. On obtient pour l'animal entier un chiffre total égal à 26 % de la radioactivité de la moule-aliment (après 3 jours en eau courante à la suite de la «digestion»).

On remarque que le tégument dorsal du bras alimenté aboralement a gardé à lui seul 41,5% de la radioactivité absorbée (30% sous forme «incorporée»). Le coecum accroché au-dessous de lui par son mesentère a acquis une radioactivité notable. Les 4 autres bras, ensemble, ont à peu près la même radioactivité que le bras traité, seul. Les aliments paraissent avoir migré par le tégument aboral et les sinus aboraux. Il conviendrait de reprendre longuement ces expériences avec plus de précision, en nourrissant p. ex. 2 bras voisins avec des extraits très radioactifs (branchies de moules très marquées lyophilisées) tandis qu'on prélèverait des fragments d'organes un peu partout pour faire de patients comptages.

V. Autoradiographie

Ayant utilisé pour mes premières recherches (non publiées) des chlorelles fortement marquées au $^{14}CO_2$ (du C.E.N. de Saclay) que j'incorporais à de la gélatine, j'ai ensuite utilisé cette pâtée à forte activité spécifique à réaliser des autoradiogrammes dont je donne ci-dessous quelques clichés. Les fig. 10, 11, 12 se rapportent à un petit *Psammechinus miliaris* (7 mm) nourri d'un peu de cette gelée sur son pôle apical, remis en eau propre et bien lavé avant d'être fixé au formol marin, décalcifié au T.C.A. puis à l'E.D.T.A. puis inclus à la celloïdine-paraffine pour coupes «in toto». Les préparations ont été trempées dans l'émulsion Ilford G_2 puis exposées 6 semaines à 4 °C avant révélation. La fig. 10 montre la pénétration des molécules radioactives dans l'extrémité d'un pied ambulacraire. Elle est assez profonde et se produit tant sur les surfaces latérales qu'au niveau du disque (surtout sur les bords et au centre). La fig. 11 prise au même niveau montre un marquage très net dans la matrice du test et un noircissement des parois des ampoules en communication avec le pied.

La fig. 12 représente une section oblique de la base d'un piquant. Tant les 4 paquets de fibres conjonctives de la matrice que les 2 paquets musculeires de chaque côté sont très soulignés.

Avec la même technique (mais l'émulsion L 4), nous avons coupé transversalement et autoradiographié un morceau de test aboral découpé autour de fasciole interne d'un *Echinocardium cordatum* de 4 cm nourri «dorsalement» de gelée de chlorelles actives: La fig. 13 montre la section de 3 clavules du fasciole interne et d'un petit piquant, tous bien marqués de la périphérie vers l'intérieur. La fig. 15 montre la pénétration dans les parois des canalicules madréporiques. La fig. 16, un peu grise, montre le marquage de la matrice du test et de la base d'un piquant. Les fig. 14 et 17 proviennent d'un assez gros oursin traité pareillement (avec l'émulsion G 2): La fig. 14 est la coupe d'un podion dorsal un peu rétracté, coloré au bleu alcian: L'épithélium et le conjonctif sont marqués. La fig. 17 montre le franchissement de l'épithélium oesophagien, le conjonctif étant déjà bien ponctué dans sa partie superficielle. Ces photographies – et d'autres encore – démontrent bien une pénétration de l'extérieur vers l'intérieur et manifestent la prédominance des piquants et des podia dans les premières phases de l'absorption cutanée.

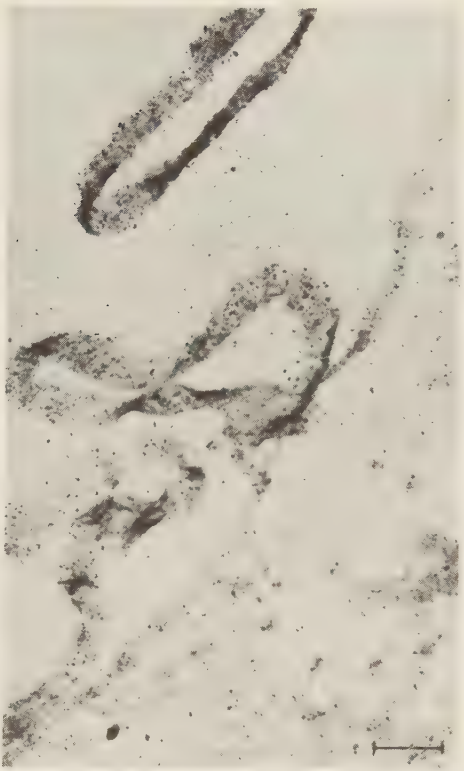


Figure 10

Extrémité d'un pied ambulacraire d'un *Psammechinus* de 7 mm nourri «dorsalement» de gélatine additionnée de chlorelles marquées au ^{14}C. Coupe in toto après décalcification. Autoradiographie par trempage dans l'émulsion Ilford L_4. Ech: 0,01 mm

Figure 10

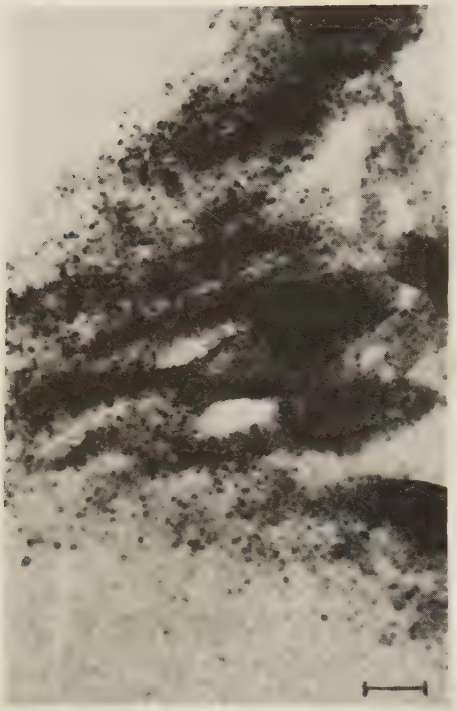
Tip of a podion of a *Psammechinus*, 7 mm in diameter, apically fed with gelatin stuffed with ^{14}C labelled chlorellae. Whole sections (decalcified). Autoradiography by dipping in Ilford L_4 emulsion. Scale: 0,01 mm

Figure 11

Même série de coupes que sur la figure 10: Test décalcifié et ampoules ambulacraires (au niveau du pied de la figure 10). Ech: 0,01 mm

Figure 11

Same section series as figure 10: Decalcified test and ambulacral ampullae just under the podion of figure 10. Scale: 0.01 mm



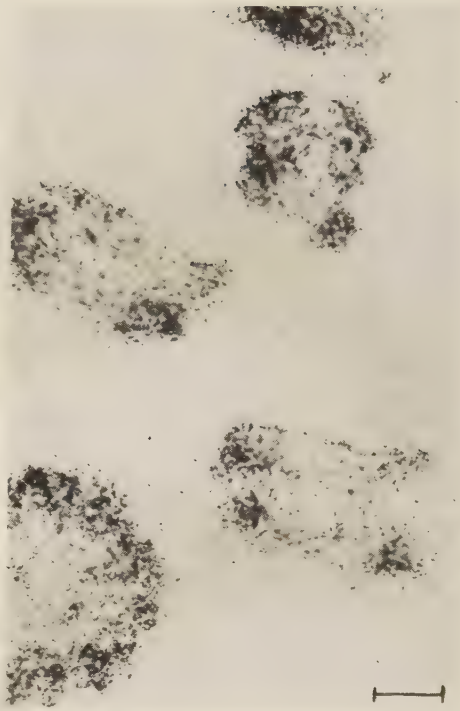


Figure 12

Même série de coupes que les figure 10 et 11. Section oblique à travers la base d'un piquant. Ech: 0,01 mm

Figure 12

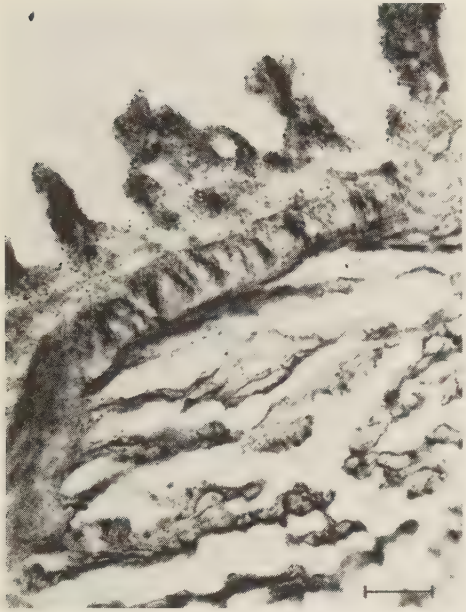
Same series as figure 10 and 11. Oblique section through the base of a spine. Scale: 0.01 mm

Figure 13

Echinocardium ayant digéré de la gelée de chlorelles radioactives dans son sillon impair. Coupes dans un morceau de test décalcifié (région du fasciole interne). Le cliché a été centré sur des sections de clavules et petits piquants. Autoradiographie avec ém. ilford L_4. Ech: 0,01 mm

Figure 13

Echinocardium having digested in its dorsal furrow ^{14}C-labelled chlorellae. Section through the decalcified aboral test. The microscope is focussed on transversal outtings of small spines and clavulae. Autoradiography with L_4 Ilford emulsion. Scale: 0.01 mm



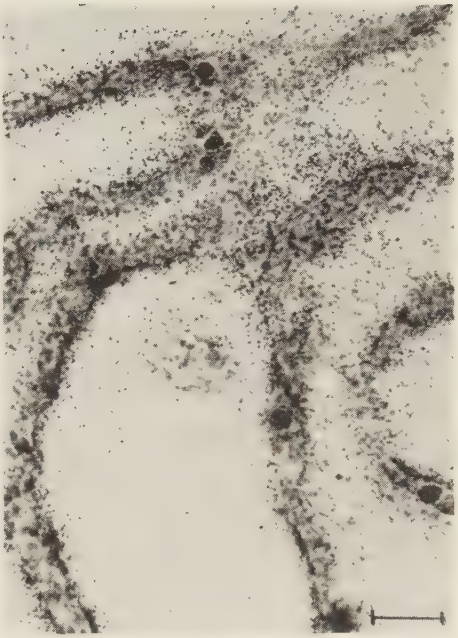


Figure 14

Coupe oblique à travers un podion dorsal à demi contracté d'*Echinocardium cordatum* nourri «apicalement» de chlorelles radioactives. Color. avec Bleu alcian avant trempage dans Ilford. Ech: 0,01 mm

Figure 14

Oblique section through a half-contracted dorsal podion of an *Echinocardium* "apically fed" with ^{14}C-labelled chlorellae-stained in alcian blue before dipping in G 2 Ilford emulsion. Scale: 0.01 mm

Figure 15

Même série que la figure 13 – Marquage des canalicules madréporiques. Ech: 0,01 mm

Figure 15

Same series as figure 13 – Labelling of the madreporic canalicule. Scale: 0.01 mm

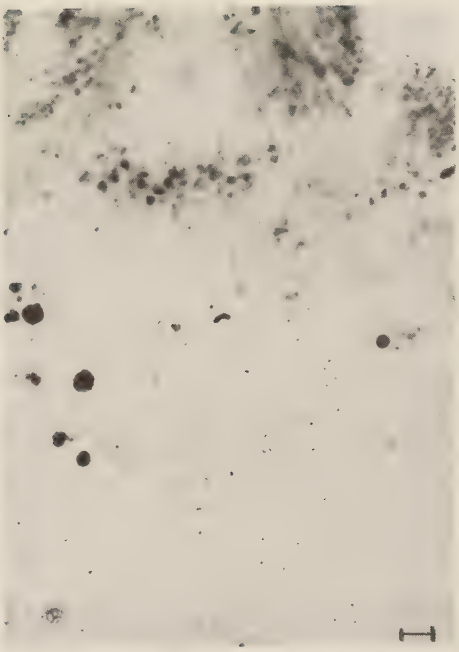


Figure 16
Même série que les figure 13 et 15. Base de piquants test décalcifié. Ech: 0,01 mm

Figure 16
Same series as in figure 13 and 15. Spine base and decalcified test. Scale: 0.01 mm

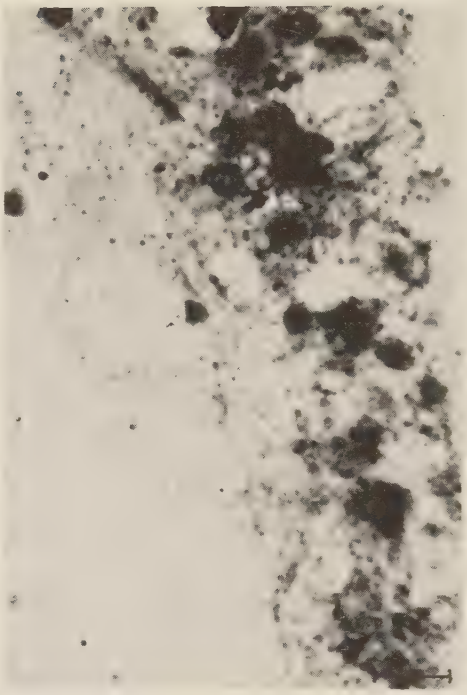


Figure 17
Oesophage d'un *Echinocardium* nourri par son sillon dorsal de chlorelles marquées au ^{14}C Emulsion G_2. Ech: 0,01 mm

Figure 17
Oesophagus of an *Echinocardium* fed with ^{14}C labelled chlorellae left in its dorsal furrow. Ilford G_2 emulsion. Scale: 0.01 mm

G. Capture de particules en suspension et de macromolécules

J'ai mis tout récemment en évidence le rôle «nettoyant» des oursins réguliers ou irréguliers maintenus en eau de mer renfermant des «suspensions». En quelques heures, une eau marine colorée au rouge neutre devient transparente. Une suspension pas trop concentrée d'Aquadag est éclaircie en plusieurs heures par un *Psammechinus.* Les grains de carbone engluées se rassemblent à la pointe des piquants dans les cannelures. Avec un *Echinocardium* dont le cocon muqueux est un véritable piège à particules, le nettoyage est encore plus rapide et la couleur noire se répand suivant les trajectoires de la fig. 5. Ces animaux captent aussi très vite des phytoflagellés en culture marine tels que: *Orchrosphaera,* ce «gros» coccolithophoride doré, *Rhodomonas,* cryptomonadine rougeâtre, ou

des volvocales vertes. Nous avons vu comment celles-ci subissent un début de digestion, en particulier dans le cordon muqueux du fond du sillon. Les *Psammechinus* accrochent plus difficilement les flagellés agiles mais retiennent bien les lourds *Ochrosphoera* que l'on retrouve dans les bavures des extrémités de piquants. Trop gros pour pénétrer dans les sillons des cannelures, il est difficile de voir s'ils sont partiellement attaqués. Je me suis demandé si de grosses molécules plus ou moins solubles ne pourraient pas aussi être captées et utilisées. En dissolvant à 60 °C de la caséine d'Hammersten dans une solution bicarbonatée et en ajoutant un peu de ce produit à de l'eau de mer filtrée stérile additionnée d'antibiotiques convenables, on obtient une solution marine bien limpide mais qui flocule avec HCl concentré. Si on y élève – avec bonne aération – une de nos 2 espèces d'oursins, on constate qu'au bout de 24 h la solution ne flocule plus avec HCl, la caséine ayant disparu. Nous mettons au point une méthode photométrique rapide de dosage de la caséine pour étudier la cinétique du phénomène. De même, de l'hémoglobine laquée ajoutée à de l'eau de mer est captée par un *Echinocardium*. Le mucus apical se colore en rouge, puis vire au grisâtre après 48 heures. Ces premiers résultats sont à rapprocher de ceux de PASTEELS (com. pers.) sur l'absorption de la caséine par les cellules branchiales de moules. Cet auteur (PASTEELS, 1969) étudiant l'absorption de la ferritine par ces cellules présente (op. cit. p. 349) des clichés électroniques très curieusement semblables à ceux que publie COBB (1968) des cellules épidermiques de pédicellaires d'*Echinus esculentus* (op. cit. fig. 2 p. 227): Mêmes mocrovilli avec voile muqueux à mi-hauteur, mêmes poches de pinocytose, mêmes lysosomes clairs vésiculeux, mêmes desmosomes intercellulaires, même ciliature ...

La nutrition cutanée des echimodermes s'effectuerait donc à différents niveaux moléculaires: Petites molécules par pénétration diffusive et adsorption; macromolécules, vraisemblablement par pinocytose; particules plus grosses encore par digestion superficielle au contact d'un mucus souvent abondant et riche en enzymes avec l'aide des coelomocytes mobiles dont les granules sont libérés au moment de leur émigration.

H. Conclusions

Ce schéma explicatif résulte d'un faisceau d'observations nombreuses, réitérées et d'expériences diverses dans leur principe et leurs méthodes sur plusieurs types caractéristiques d'échinodermes. Certes, il conviendrait de pousser certains problèmes plus à fond – dans le domaine de l'enzymologie ou de la microscopie électronique (combinée si possible avec l'autoradiographie au tritium). On pourrait aussi, avec mes propres techniques, étendre le champ de recherche à d'autres oursins (oursins de Méditerranée, cidarides, scutelles) et à des étoiles de mer microphages: NYRUP-RASMUSSEN (1967) a montré qu'*Henricia sanguinolenta* se nourrissait de protistes englués dans des cordons de mucus ambulacraires ([1]). Nous n'avons pas encore fait de tests radioactifs sur les ophiures. Pour les holothuries, FISH (1967 a et b) fait remarquer qu'un système tentaculaire efficace de capture existe et que le tube digestif renferme des enzymes. Comme d'autre part la surface corporelle est assez lisse, cet auteur conclut à l'improbabilité d'une digestion cutanée chez

([1]) Voir Addendum N° 2.

ces animaux. Mais, récemment, AHEARN et GREGORY (1968) étudiant l'absorption par *Holothuria atra* de nuclides marqués au ^{32}P a constaté que celle-ci était surtout le fait des arbres respiratoires (100 fois plus marqués que tout autre organe). Il serait intéressant de rechercher si d'autres substances organiques n'utiliseraient pas cette voie. On peut lire dans HYMAN (1955) que les fines vésicules terminant les rameaux de ces «arbres» sont tapissés d'un épithélium très fin traversé de nombreux coelomocytes, comme d'ailleurs l'estomac (HETZEL et HOWARD, 1963–5).

Chez les crinoïdes, NICHOLS (1960–1962) a bien décrit 3 types de podia «crachant du mucus» qui captent les particules alimentaires pour les amener vers les gouttières ciliées des bras. Quand on considère la grande surface de ceux-ci par rapport à celle de la rudimentaire anse digestive, on peut se demander si les micro-aliments qui convergent vers les canalicules du tegmen (perforé de trous madréporiques diffus), ne sont pas déjà en grande partie digérés sinon absorbés avant d'atteindre la bouche.

Il y aurait lieu de revoir tout le processus du «ciliary mucous feeding» chez tous ces animaux où tentacules, expansions ciliées, lophophores donnent à l'épiderme une surface de contact avec le milieu marin nourricier bien supérieure à la surface interne d'un tube digestif assez rudimentaire – quand il n'est pas absent, comme chez quelques planaires et les Pogonophores. Dans ce groupe, A. J. et E. SOUTHWARD ont montré, à Plymouth, que *Siboglinum* absorbait par les tentacules les amino-acides dissous, captaient par pinocytose la ferritine et les auteurs n'excluent pas une digestion cutanée dans la région du segment céphalique. Jusqu'ici on n'a considéré la «ciliary mucous feeding» que comme un moyen de capture et de transport de très petites proies vers la bouche: Il s'agit de voir s'il n'y a pas prédigestion et absorption partielles en cours de route. PASTEELS (op. cit.) a montré que le bord cilié des branchies de moules absorbait des amino-acides et même des protéines, mais il a aussi remarqué (com. pers.) que le cordon muqueux marginal poussé par les cils contenait des granules à forte activité phosphatasique provenant des cellules à mucus et qui doivent avoir des fonctions enzymatiques.

Ces nouvelles fonctions de l'ectoderme heurtent au premier abord nos anciennes idées anthropocentriques sur la spécialisation systématique des systèmes d'organes tels qu'on peut les disséquer chez un vertébré ou un arthropode. Ces 2 grands phyla ont évolué très loin dans le sens de la création d'un milieu intérieur autonome enfermé dans une peau stratifiée kératinisée ou une cuticule chitineuse. Celà a permis à ces êtres de conquérir la terre et de vivre dans l'air sec, moyennant la différenciation d'appareils complexes apportant au milieu intérieur brassé par la circulation l'oxygène et les métabolites sous une forme utilisable et en assurant l'épuration et la constance physico-chimique. Mais chez beaucoup de petits animaux marins où toutes les cellules sont en contact direct avec la mer toujours renouvelée, physiquement stable, offrant de l'oxygène tout dissous et des matières organiques diffuses, un autre type d'évolution peut conduire certains groupes animaux non plus à «enfermer» leurs organes mais à étaler leurs tissus sur la plus grande surface de contact possible: C'est évident pour les colonies de coelentérés, les bryozoaires, de nombreux animaux planctoniques et enfin pour les échinodermes: Morphologiquement, ces derniers sont des coelomates mais le coelome n'est encore ici qu'une poche d'eau de mer baignant l'intestin et les gonades et séparé par un «squelette» de tous les organes

externes, hérissés au contact du milieu extérieur. Chez ces animaux qui n'ont pas de système nerveux ganglionnaire bien centralisé ni de système circulatoire, les divers tissus et organites (piquants, pédicellaires) ont une large autonomie et il est normal qu'ils entretiennent avec l'eau de mer ambiante des rapports directs sur le plan de la respiration, de l'excrétion et de la nutrition, un peu à la manière des polypes d'une colonie des cnidaires. Ce procédé de nutrition immédiate doit jouer un rôle considérable chez les larves. Chez des échinodermes adultes essentiellement microphages tels que les crinoïdes ou les oursins fouisseurs, il pourrait bien jouer le rôle essentiel. Par contre chez les «prédateurs» comme les oursins à lanterne d'Aristote ou les astéries à estomac protractile qui ont à entretenir un métabolisme plus actif et développent intérieurement de volumineuses gonades, des mécanismes nutritifs plus spécialisés et à plus haut rendement se sont développés dans la région péribuccale et stomodoeale. Ils n'en conservent pas moins un mécanisme ancestral de nutrition cutanée qui doit assurer un apport alimentaire non négligeable aux tissus superficiels. Je souhaite que, dans cette optique nouvelle, des recherches ultérieures viennent compléter et préciser les phénomènes que j'ai cherché à mettre ici en évidence : elles permettront peut être de mieux comprendre l'économie océanique et la nature des échanges matériels entre les habitants de la mer.

Ce mémoire contient l'essentiel d'une thèse de Doctorat ès Sciences soutenue par l'auteur le 17. Juin 1969 devant le Pr. P. E. LUBET, président du jury, le Pr. C. BOCQUET (Sorbonne), le Pr. P. FROMAGEOT (C.E.N., Saclay) et le Pr. N. DEMEUSY (Caen). J'exprime ma reconnaissance à ces personnalités pour le soin bienveillant avec lequel elles ont examiné ce travail en grande partie effectué dans leurs laboratoires. Je remercie également pour leur aide et leurs avis les Professeurs J. BOUILLON, de Bruxelles, J. CACHON, de Nice ainsi que le Dr. F. BENARD. Enfin, je ne saurais oublier tous me collègues du laboratoire de Zoologie de Caen et de la Station maritime de Luc dont quelques uns sont cités dans cet article. Leur soutien matériel et moral m'a été très précieux.

Le grade de Docteur m'a été conféré par l'Université de Caen et ma thèse est enregistrée au Service de Documentation du C.N.R.S. à Paris (15, Quai Anatole France) sous le N° A.O.–3344.

1er Addendum: (A, II, d) J'ai récemment mesuré l'âge des tests récoltés par la nouvelle méthode mise au point par JENSEN (Sarsia 37, 41–44, 1969). Par chauffage puis éclaircissement dans le benzoate de méthyle on met en évidence les stries annuelles de croissance des plaques : tous les âges supposés de mes échantillons de Normandie sont confirmés par ce procédé. Quant aux échantillons de Vertbois (Oléron), les petits ont bien une année d'âge alors que les plus gros ont tous 2 ans même ceux approchant 5 cm de long.

2ème Addendum: (H, Conclusions) FERGUSON (Biol. Bull. June 1969) vient d'appliquer à la nutrition microphage d'*Echinaster* des méthodes radioactives. Il constate qu'un pompage exercé par les poches de TIEDEMAN vers les coeca pyloriques se produit lorsque les aliments dissous ou en suspension dans le milieu sont assez concentrés. Au dessous d'un certain seuil, on ne trouve presque pas de radioactivité dans les coeca, mais on constate un appréciable absorption directe par la paroi corporelle, même lorsqu'il s'agit de protéines, d'algues radioactives. L'auteur admet la possibilité d'une «external digestion» de ces protéines, rejoignant ainsi mon propre point de vue.

Bibliographie

AHEARN, G. A. : A comparative study of P^{32} uptake by *Holothuria atra.* Biol. Bull. **134**, 367–388 (1968).

ALLIOT, E. et J. BOCQUET : Prés. d'un système chitinolytique dans le tube digestif de *Scylliorhinus.* C. R. Soc. Biol. **161**, 840 (1967).

BASS, N., L. G. et J. M. CHAPMAN : Uptake of leucine by larvae and adults of *Nereis.* Nature **221**, 476–477 (1969).

BEERS, C. : *Urceolaria spinicola* n. sp. J. Protozool. **11**, 430–435 (1964).

BERG, W. : Kinetics of uptake of valine by sea urchin embryos. Exp. Cell. Res. **49**, 379–395 (1968).

BOOLOOTIAN, R. A. : The perivisceral elements of the Echinoderm bodyfluid. Amer.Zool. **2**, 275–284 (1962).

BOOLOOTIAN, R. A. : «The Physiology of Echinodermata». New-York and London. Interscience Publ. John Wiley (1966).

BOOLOOTIAN, R. A., et J. L. CAMBELL : A primitive heart in the Echinid *Strongylocentrotus purpuratus.* Science **145**, 173–175 (1964).

BUCHANAN, J. B. : Glandular elements in tubefeet of British ophiuroids. Proc. Zool. Soc. London **138**, 645–650 (1962).

BUCHANAN, J.B. : The biology of *Echinocardium cordatum* from different habitats. J. Mar. Biol. Ass. U.K. **46**, 97–114 (1966).

BUCHANAN, J. B. : Feeding and control of volume within the tests of regular sea urchins. J. Zool. London **159**, 51–64 (1969).

BURTON, M. : Circulatory system of Echinids. Nature **204**, 4964–5128 (1964).

CHAET, A. B., et G. PHILPOT : A new subcellular particle secreted by the starfish. J. Ultramic. Res. **11**, 354–363 (1964).

CHAPMAN, G., et A. G. TAYLOR : Uptake of organic solutes by *Nereis virens.* Nature **221**, 476–477 (1968).

CHARNEY, J., et R. M. TOMARELLI : A colorimetric method for the determination of proteolytic activity. J. Biol. Chem. **171**, 501–505 (1947).

COBB, J. L. : The fine structure of the epithelium of pedicellariae of *Echinus esculentus.* J. Roy. Micr. Soc. **88**, 223–233 (1968).

COLIN, L., et L. G. BRIJ : Pogonophora : uptake of dissolved nutrients. Nature **218**, 873–874 (1968).

CUENOT, L. : Contribution à l'étude anatomique des Astérides. Arch. Zool. Exp. 2ème S. **V bis**, 1–144 (1887).

CUENOT, L. : Contributions à la faune du Bassin d'Arcachon V. Echinodermes. Bull. Stat. Biol. Arcachon **14** (1912).

CUENOT, L. : Echinodermes: Traité de Zoologie. P. Grassé. Tome XI, Paris, Masson (1948).

DAOUST, R. : Histochemical localisation of enzyme activities by substrate film method. Int. Rev. Cytol. **18**, 191 (1965).

DEFRETIN, R. : Sur les mucocytes des podia de quelques échinodermes. C.R. AC. Sc. Paris **234**, 1806–1808 (1952).

ELDEFRAWZI, M. : Liquid scintillation counting of ^{3}H and ^{14}C compounds in animal tissues. Anal. Biochem. **17**, 353–355 (1966).

FARMANFARMAIAN, A. : The respiratory surface of *Strongylocentrotus purpuratus.* Anatom. Rec. **134**, 561 (1959).

FARMANFARMAIAN, A., et J. PHILLIPS : Digestion, storage and translocation of nutrients in *Strongylocentrotus purpuratus.* Biol. Bull. **123**, 105–120 (1962).

FERGUSON, J. C.: The physiology and mechanism of nutrient transport in *Asterias forbesi.* Thèse Cornell University (1963 a).

FERGUSON, J. C.: An autoradiographic study of the distribution of ingested nutrients in *A. forbesi.* Amer. Zool. **3**, 542 (1963 b).

FERGUSON, J. C.: Nutrient transport in starfish. Properties of the coelomic fluid. Biol. Bull. **126**, 33–53 (1964a).

FERGUSON, J. C.: Nutrient transport in starfish. II – (Absorption by isolated organs). Biol. Bull. **126**, 391–406 (1964 b).

FERGUSON, J. C.: Utilization of dissolved nutrients by starfishes Biol. Bull. **132**, 161–173 (1967 a).

FERGUSON, J. C.: Autoradiographic study of the utilization of free exogenous aminoacids. Biol. Bull. **133**, 317–329 (1967 b).

FERGUSON, J. C.: Feeding activity of *Echinaster* and its induction by dissolved elements. Biol. Bull. **136**, 374–384 (1969).

FISH, J.: Digestive system of *Cucumaria elongata*.Biol. Bull. **132**, 337–353 (1967 a).

FISH, J.: The Biology of *Cucumaria elongata.* Biol. Bull. **132**, 354–361 (1967 b).

FRATELLO, B.: Stain Technology **43**, 125 (1968).

GIESE, A. C.: Size indexes in *Strongylocentrotus purpuratus.* Physiol. Zool. **40**, 194–201 (1967).

GOODING, R. U.: Parasitic copepod *Macropus.* J. Mar. Biol. Ass. **36**, 195 et suiv. (1957).

HETZEL, HOWARD, R.: Studies on holothurian coelomocytes. Biol. Bull. **125**, 289–311 (1963).

HETZEL, HOWARD, R.: Studies on holothurian coelomocytes II. Biol. Bull. **128**, 102–111 (1965).

HOLLAND, N. D., et Sister AQUINAS NIMITZ: An autoradiographic and histological investigation of the gut mucopolysaccharides of *Strongylocentrotus purpuratus.* Biol. Bull. **127**, 280–293 (1964).

HOWARD, M., et FEDER: On the methods used by the starfish *Pisaster ochraceus* in opening bivalves. Ecology **36**, (1955).

HYMAN, L.: «The Invertebrates» Vol. IV (Echinoderms). McGrawhill ed. (1955).

JEUNIAUX, C.: Chitine et chitinolyse. Paris, Masson, ed. (1962).

KINDRED, J.: Phagocytosis and clotting of the perivisceral fluid. Biol. Bull. **41**, 144–152 (1921).

LAFON, M.: Etude de la faune des sables côtiers du Calvados. Ann. Inst. Océanog. Monaco **NS 28**, 152 (1953).

LARSONNEUR, C., et P. HOMMERIL: Sédiments de la partie orientale de la baie de Seine. Rev. Soc. Savantes. Haute Normandie, Sciences **47**.

LASKER, R., et A. C. GIESE: Nutrition of *Strongylocentrotus purpuratus.*Biol. Bull. **106**, 328–340 (1954).

LAVOIE, M.: How sea stars open bivalves. Biol. Bull. **111**, 175–217 (1956).

LAWRENCE, A. L., LAWRENCE, J. M., et N. D. HOLLAND: Anuual cycle in the size of the gut in *Strongylocentrotus purpuratus.* Nature **205**, 1238.

MILLOTT, N., et F. W. JACOBSON: Disintegration of coelomocytes. Z. Haut- u. Geschlechtskr. **13**, (1950).

MILLOTT, N., et A. G. VEVERS: The morphology and histochemistry of the axial organ. Phil. Trans. Roy. Soc. London B. **785**, 201–230 (1968).

MOORE, H. B.: The biology of *Echinocardium cordatum.* J. Mar. Biol. Ass. UK **XX**, 665–671 (1936).

NICHOLS, D.: The histology of tube-feet and clavulae of *Echinocardium cordatum.* Quart. J. micr. Sci. **100**, 74–78 (1959 a).

NICHOLS, D.: Changes in the chalk heart-urchin *Micraster.* Phil. Trans. Roy. Soc. **B. 242**, 347–357 (1959b).

NICHOLS, D.: The histology and activity of the tubefeet of *Antedon bifida*. Quart. J. micr. Sci. **101**, 105–107 (1960).

NICHOLS, D.: Differential selection in the heart urchin *Echinocardium cordatum*. Taxonomy and Geography **4**, 105–118 (1962).

NICHOLS, D.: «Echinoderms». Hutchinson Uny. Library. London (1962)

NYRUP-RASMUSSEN, B.: Studies on *Henricia sanguinolenta*. Medd. f. Dansk-Fisk-o-Hav-Unders (Ny Serie) **4**, 157–213 (1967).

OKAFOR: In ALLIOT E., et J. BOCQUET (1967).

PASTEELS, J. J.: Pinocytose et arthrocytose par l'épithélium branchial de *Mytilus*. Z. f. Zellforsch. **92**, 339–359 (1968).

PEQUIGNAT, E.: «Skin-digestion» and epidermal absorption in irregular and regular urchins. Nature **210**, 397–399 (1966 a).

PEQUIGNAT, E.: Observations sur les cellules mobiles d'*Echinocardium* et de *Psammechinus*. Bull. Soc. Linn. Normandie 10e Ser. **7**, 22–236 (1966 b).

PEQUIGNAT, E.: Absorption d'aminoacides dissous et de particules en suspension par les oursins. C. R. Soc. Biol. **163**, 101–104 (1969 a).

PEQUIGNAT, E.: Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences de CAEN (1969 b).

PEQUIGNAT, E., et J. P. PUJOL: Absorption de proline tritiée par *Psammechinus* et sa fixation sur le collagène. Bull. Soc. Linn. Normandie 10e Série **9**, 209–219 (1968).

PEQUIGNAT, E., et Y. TIFFON: Mise en évidence d'un activité amylolytique cutanée chez les Echinides. C. R. Acad. Sc. Paris **264**, 3014–3015 (1967).

PÜTTER, A.: Die Ernährung der Wassertiere durch gelöste organische Verbindungen. Pflügers Arch. ges. Physiol. **137**, 595–621 (1911)'

RANSON, G.: Absorption des matières organiques par les bivalves et verdissement des huitres. Ann. Inst. Océanog. N. Série **4**, (1927).

ROBERTSON, D.: Notes on *Echinocardium cordatum*. Quart. J. Micr. Sc. **11**, (1871).

SOUTHWARD, A. J., et E. SOUTHWARD: Uptake and incorporation of labelled glycin by Pogonophora. Nature **218**, 875–876 (1968).

STEPHENS, G. C.: Uptake of organic material by aquatic invertebrates (*Clymenella*). Comp. Bioch. Physiol. **10**, 191–202 (1963).

STEPHENS, G. C.: Uptake of organic material . . . (Brackish water annelids). Biol. Bull. **126**, 150–162 (1964).

STEPHENS, G. C.: Uptake of organic material . . . (*Ophiactis*). Biol. Bull. **131**, 172–185 (1966).

STEPHENS, G. C.: Dissolved organic matter as a potential source of nutrition. Amer. Zool. **5**, 661 (1965).

STOTT, F. C.: The food-canal of *Echinus esculentus*. Proc. Zool. Soc. London **125**, 63–87 (1955).

SYMPOSIUM ZOOL. SOC. London, in May 1966: Volume on «Biology of Echinoderms» N.Y. Ac. Press (1967).

URSIN, E.: A quantitative investigation of the Echinoderm fauna of the Central North Sea. Medd. f. Dan. Fisk. O. Hav unders **2**, 1–204 (1960).